Über die Biosynthese des Riboflavins

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Adelbert Bacher
aus Birkenfeld

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0031

Über die Biosynthese des Riboflavins

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Adelbert Bacher

aus Birkenfeld

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 1o. Juli 1969
Dekan: Prof. Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lingens
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lingens am Chemischen Institut der Universität Tübingen und am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim angefertigt. Herrn Prof. Dr. F. Lingens danke ich für grosszügige Unterstützung und zahlreiche wertvolle Diskussionen sowie die mir bei der Arbeit gewährte Freizügigkeit. Herrn Dr. O. Oltmanns danke ich für Unterstützung bei der Isolierung von Hefemutanten. Herrn Prof. Dr. H. Zähner bin ich für die Gelegenheit zur Benutzung der Fermentationsanlage im Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen zu Dank verpflichtet. Dem Direktor des Chemischen Instituts der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. Eugen Müller, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Die Biosynthese des Riboflavins nach dem bisherigen Kenntnisstand	2
2.1.	Purine als Vorläufer des Riboflavins	2
2.2.	Isolierung und enzymatische Umwandlung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	3
2.3.	Unsichere und zweifelhafte Resultate	5
3.	Ergebnisse	7
3.1.	Untersuchungen an Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae	7
3.1.1.	Nachweis von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	7
3.1.2.	Wachstumswirkung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	9
3.1.3.	Nachweis von 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin	10
3.1.4.	Wachstumswirkung von Diacetyl	14
3.1.5.	Nachweis von 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin. Isolierung und Strukturaufklärung von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin	15
3.1.6.	Isolierung von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin	24
3.1.7.	Isolierung von 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin	26
3.1.8.	Wachstumsversuche mit Ribitylaminopyrimidinen	27
3.1.9.	Isolierung weiterer Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae	27
3.1.10.	Einfaches Verfahren zur biochemischen Klassifizierung von Riboflavinmangelmutanten	28
3.2.	Untersuchungen an Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes. Nachweis des Verzweigungspunktes von Purin- und Riboflavinbiosynthese	30
3.2.1.	Isolierung von Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes	32
3.2.2.	Einbau radioaktiv markierter Purine in Riboflavin und Xanthosin	33
3.3.	Isolierung von Candida guilliermondii-Mangelmutanten	36
4.	Diskussion	37

Seite

5. Material und Methoden 47
5.1. Geräte 47
5.2. Reagenzien 47
5.3. Kulturmedien 48
5.4. Stämme 49
5.5. Synthese von 2-^{14}C-Xanthin 50
5.6. Isolierung von Mangelmutanten 51
5.6.1. Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae 51
5.6.2. Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes 51
5.6.3. Mangelmutanten von Candida guilliermondii 52
5.7. Isolierung und Untersuchung von Hefeakkumulaten 53
5.7.1. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen 53
5.7.2. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, 8-Ribityllumazin und Riboflavin 54
5.7.3. 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribityl-pteridin 55
5.7.4. 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin 56
5.7.5. 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin 57
5.8. Wachstumsversuche 58
5.9. Einbau radioaktiv markierter Purine bei Purin-mangelmutanten von Aerobacter aerogenes 58
5.9.1. Züchtung und Akkumulation 58
5.9.2. Isolierung von Riboflavin und Xanthosin 59
5.9.3. Radioaktivitätsmessung 60

6. Zusammenfassung 62

7. Literaturangaben 64

1. Einleitung

Kuhn und Mitarbeiter isolierten 1934 aus Molke eine gelb fluoreszierende Substanz, die für das normale Wachstum junger Ratten unentbehrlich ist. Sie wurde wegen ihrer gelben Farbe und ihres Vorkommens in der Milch als Lactoflavin bezeichnet. Kuhn konnte zeigen, dass sich die Substanz strukturell von Isoalloxazin ableitet. Die von Kuhn aufgestellte Strukturformel wurde von Karrer und wenig später auch von Kuhn selbst durch Synthese bestätigt.

Sehr bald gewann man auch Einblick in die physiologische Bedeutung dieser Substanz. Es zeigte sich nämlich, dass ihr Phosphorsäureester, das Flavinmononucleotid, ein Bestandteil des von Warburg isolierten gelben Atmungsferments ist. Seither wurden Flavinmononucleotid und Flavinadenindinucleotid als prosthetische Gruppen in zahlreichen Redoxenzymen nachgewiesen.

Seit zwei Jahrzehnten sind zahlreiche Untersuchungen über den Biosyntheseweg des Lactoflavins, welches inzwischen zu Riboflavin umbenannt wurde, angestellt worden. Die gewonnenen Erkenntnisse blieben jedoch fragmentarisch.

2. Die Biosynthese des Riboflavins nach dem bisherigen Kenntnisstand

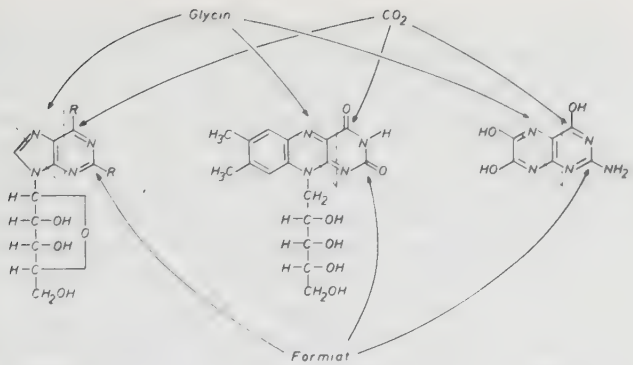
Obwohl über die Biosynthese des Riboflavins über hundert Untersuchungen aus verschiedenen Arbeitskreisen vorliegen, waren bisher nur zwei Tatsachen gesichert: 1. Die Biosynthese des Riboflavins beginnt mit einem Purinderivat unbekannter Struktur und 2. das unmittelbare Vorprodukt des Riboflavins ist 6,7-Dimethyl-8-ribitylluma-zin.

2.1. Purine als Vorläufer des Riboflavins

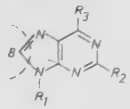
Gewisse Mikroorganismen aus verschiedenen taxonomischen Gruppen geben unter bestimmten Kulturbedingungen mehr oder weniger grosse Riboflavinmengen (bis zu 2 g/l) an das Kulturmedium ab (1). Untersuchungen über die Biosynthese des Vitamins wurden bisher meist an derartigen Organismen ausgeführt.

Mc Laren (2) fand 1952, dass die Riboflavinproduktion des flavinogenen Pilzes Eremothecium ashbyii durch verschiedene Purinderivate um 30 - 60 % gesteigert werden kann. Pyrimidine beeinflussen die Riboflavinbildung nicht. Später hat Plaut (3) gezeigt, dass $^{14}CO_2$, ^{14}C-Formiat und ^{14}C-Glycin mit übereinstimmender Isotopenverteilung in Purine und in Riboflavin eingebaut werden. Diese Beobachtung wurde von Weygand und Waldschmidt (4) auf die Bildung von Leukopterin bei Pieris brassica ausgedehnt.

Weiterhin hat Mc Nutt (5) nachgewiesen, dass uniform markiertes ^{14}C-Adenin, nicht hingegen 8-^{14}C-Adenin durch Eremothecium ashbyii in Riboflavin umgewandelt wird. Daraus



folgt, dass im Verlauf der Riboflavinbiosynthese das 8-ständige Kohlenstoffatom eliminiert wird.



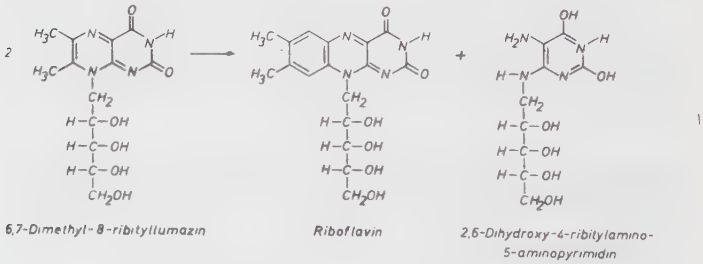
Schliesslich konnten Howells und Plaut (6) mit Hilfe einer Purinmangelmutante von Escherichia coli nachweisen, dass Riboflavin aus einem fertigen Purinkörper und nicht aus einer biogenetischen Vorstufe der Purine entsteht. Ungeklärt blieb jedoch, welche spezielle Purinverbindung als Ausgangsprodukt der Riboflavinbiosynthese dient.

2.2. Isolierung und enzymatische Umwandlung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin

Masuda (7,8) isolierte 1956 aus Kulturen von Eremothecium ashbyii eine grün und eine blau fluoreszierende Substanz, die er Substanz G bzw. V nannte. Die Substanz G hielt Masuda (9, 10) auf Grund von Abbauversuchen für 6,7-Dimethyl-

8-ribityllumazin. Später wurde die Substanz von Maley und Plaut (11) aus Ashbya gossypii isoliert und die von Masuda vorgeschlagene Struktur durch Synthese bestätigt. Substanz V wurde als 6-Methyl-7-hydroxy-8-ribityllumazin identifiziert. (12,13).

Durch Behandlung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin mit Diacetyl erhielt Masuda (14) Riboflavin. Rowan und Wood (15) erhielten Riboflavin in 55 % Ausbeute durch einfaches Erhitzen einer wässrigen Lösung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin unter Stickstoff. Als erste haben Maley und Plaut (16) gezeigt, dass diese Umsetzung durch Enzymextrakte aus Ashbya gossypii katalysiert wird. Ihre Befunde wurden durch Untersuchungen an mehreren anderen Mikroorganismen bestätigt (17). Für die Umwandlung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in Riboflavin ist die Anlagerung von 4 Kohlenstoffatomen erforderlich. Plaut (18,19) hat durch Verwendung von 6,7-^{14}C-Dimethyl-8-ribityllumazin gezeigt, dass diese Verbindung auch als 4-C-Donor herangezogen wird. Aus zwei Mol 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin entsteht ein Mol Riboflavin. Als Nebenprodukt entsteht das sehr labile 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin (20).



6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin — Riboflavin — 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin

Die Riboflavinsynthetase der Bäckerhefe wurde von Harvey und Plaut (21) etwa 2000-fach angereichert. Das Molekulargewicht des aussergewöhnlich labilen Enzyms konnte bisher nicht ermittelt werden. Durch kinetische Untersuchungen ließ sich jedoch zeigen, dass zwei verschiedene Bindungsstellen für das Substrat, 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, vorhanden sind. Das Hefeenzym wird durch Riboflavin kompetitiv stark gehemmt, das Enzym aus Ashbya gossypii wird hingegen nicht gehemmt.

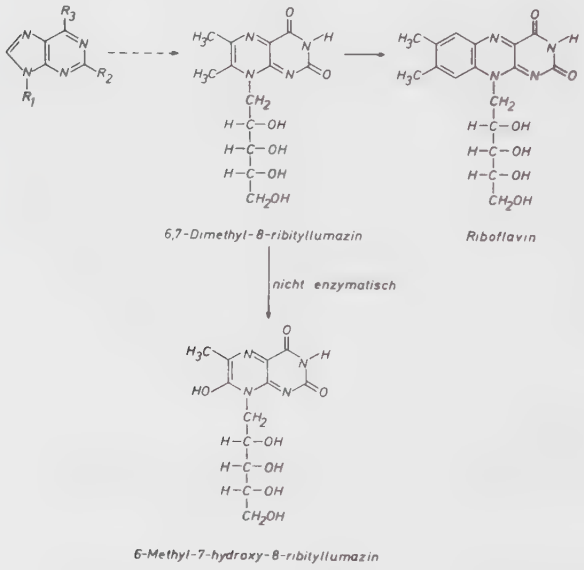
2.3. Unsichere und zweifelhafte Resultate

6-Methyl-7-hydroxy-8-ribityllumazin wurde von Masuda (8) aus Ashbya gossypii isoliert und von Plaut und Maley (12) synthetisiert. Masuda und Mitarbeiter (22) nahmen an, dass diese Substanz aus 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-amino-pyrimidin und Brenztraubensäure gebildet wird. Plaut (23) konnte diesen Befund nicht bestätigen. Die Entstehung von 6-Methyl-7-hydroxy-8-ribityllumazin aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in Gegenwart von Enzymextrakten aus Eremothecium ashbyii haben Kuwada und Mitarbeiter (24) beobachtet. Plaut (23) hat jedoch darauf hingewiesen, dass diese Umsetzung unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen auch spontan abläuft. Sie wird durch Belüftung und Hydroperoxyd beschleunigt. Plaut nimmt an, dass dem 6-Methyl-7-hydroxy-8-ribityllumazin lediglich die Rolle eines durch Autoxydation entstandenen Zerfallsprodukts zukommt.

Der gesamte Benzolring des Riboflavins entsteht aus den beiden Methylgruppen und den C-Atomen 6 und 7 des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins, wie vorstehend beschrieben. Über die Herkunft dieser 4 C-Atome ist nichts Sicheres bekannt. Goodwin und Treble (25) fanden, dass ^{14}C-Acetoin von Eremothecium ashbyii in Riboflavin eingebaut wird. Ali und Al-Khalidi (26) fanden hingegen bei entsprechenden

Versuchen keinen signifikanten Einbau. Da die Befunde von Goodwin und Treble nur in Kurzform veröffentlicht wurden, sind die Resultate nur bedingt vergleichbar. Plaut (27) hat gezeigt, dass ^{14}C-Acetat zu 40 - 60 % eingebaut wird. Die Isotopenverteilung war jedoch komplex und sprach nicht für eine direkte Beteiligung von Acetat.

Die bisherigen Ergebnisse sind in folgendem Schema zusammengefasst:



Über die Zwischenstufen, die bis zum 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin durchlaufen werden, ist bisher nichts bekannt.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen an Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae

Bei der Untersuchung der Biosynthesewege von Aminosäuren hat sich die Verwendung von Mangelmutanten sehr bewährt. Untersuchungen über die Biosynthese des Riboflavins haben sich bisher weitgehend auf die in grosser Anzahl bekannten Mikroorganismen mit überschiessender Riboflavinproduktion beschränkt.

Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae wurden erstmals von Oltmanns und Lingens (28) isoliert. Die Mutanten benötigen zum Wachstum eine ungewöhnlich hohe Riboflavinkonzentration (0,5 - 10 mg/l). Ein Teil der Mutanten akkumuliert Zwischenprodukte der Riboflavinbiosynthese, über deren Isolierung und Strukturaufklärung im folgenden berichtet wird. Da es sich hierbei zum Teil um äusserst lichtempfindliche Substanzen handelt, wurden alle Arbeiten im Dunkeln oder unter weitgehendem Lichtausschluß ausgeführt.

3.1.1. Nachweis von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin

Die Mutante HK 750 akkumuliert in riboflavinfreiem Minimalmedium eine im UV-Licht grün fluoreszierende Substanz. Diese liess sich folgendermassen isolieren: Die Mutante wurde in Flaschen mit Komplettmedium angezogen, mit Salzlösung gewaschen und in riboflavinfreiem Minimalmedium suspendiert. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium von Zellen befreit, im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und auf eine Säule aus Dowex 50, H^+-Form, gegeben. Mit deion. Wasser liess sich eine grün

fluoreszierende Substanz eluieren, die durch Chromatographie an saurem Aluminiumoxid und an Dowex 50 weiter gereinigt wurde. Später zeigte sich, dass die Substanz auf einfachere Weise durch Adsorption an Magnesiumsilikat und Elution mit Aceton/Ammoniak vom Medium abgetrennt werden kann. Aus 2 l Minimalmedium wurden ca. 0,5 mg einer gelben, in wässriger Lösung intensiv grün fluoreszierenden Substanz erhalten. Sie konnte durch UV-Spektroskopie und vergleichende Dünnschichtchromatographie als 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin identifiziert werden. Die UV-Maxima und R_f-Werte sind in Tab. 1 und 2 zusammengestellt.

Substanz	Herkunft	p_H	Absorptionsmaxima nm			
6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	Synthese	7	406	257		
		13	312	279	227	
	HK 750	7	405	257		
		13	312	279	227	
	HK 645/Diacetyl	7	409	255		
		13	308	279	227	
8-Ribityllumazin	Synthese	7	398	258		
		13	308	280	236	
	HK 645/Glyoxal	7	398	258		
		13	313	279	234	
Riboflavin	Synthese	7	445	372	267	223
	HK 645/Diacetyl	7	445	372	267	222
4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin	Synthese	1	400	285	257	
		7	410	318	268	230
		13	312	282	271	233
	HK 859/Diacetyl	1	401	286	256	
		7	412	316	268	230
		13	312	282	267	232
2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-pteridin	Synthese	1	322	248		
		7	345	274	236	
		13	362	253		
	HK 859	1	322	248		
		7	347	274	238	
		13	363	254		
2,6-Diamino-4-hydroxypteridin	Synthese	1	377	271		
		13	392	260		
	HK 859	1	379	271		
		13	393	262		

Tab.1. UV-Maxima von Hefeakkumulaten und synthetischen Vergleichssubstanzen

	R_f-Werte					Fluoreszenz	
	I	II	III	IV	V	in Luft	in NH_3-Atmosphäre
6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	0,78	0,29	0,31	0,67	0,60	grün	-
8-Ribityllumazin	0,84	0,22	0,25	0,60	0,86	grün	-
Riboflavin	0,36	0,48	0,47	0,42	0,31	gelb	gelb
2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin	0,40	0,58	0,60	0,45		hellblau	verstärkt hellblau
6,7-Dimetyllumazin	0,60	0,64	0,57	0,60		-	hellblau
4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin	0,83	0,38	0,29	0,60	0,52	dunkelgrün	-
2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpterin	0,51	0,46	0,24	0,53		hellblau	verstärkt hellblau
2,6-Diamino-4-hydroxypteridin	0,26	0,13	0,35			grün	grün

I	3% NH_4Cl		Zellulose MN 400
II	n-Butanol / Eissig / Wasser	60 : 15 : 25	
III	n-Butanol / Äthanol / Wasser	50 20 : 30	
IV	iso-Propanol / konz Ammonik / Wasser	60 2 38	
V	3% NH_4Cl		Kieselgel H

Tab.2. R_f-Werte von Hefeakkumulaten

3.1.2. Wachstumswirkung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin

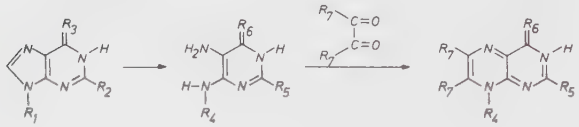
Riboflavinmangelmutanten, deren genetischer Block vor dem 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin liegt, sollten in der Lage sein, diese Substanz anstelle von Riboflavin zu verwerten.

Zunächst wurde durch Flüssigtest (29) und Bioautographie (30) mit Lactobacillus casei als Testorganismus festgestellt, dass unser synthetisches Präparat 0,16 % Riboflavin enthielt. Die Wachstumswirksamkeit dieses Präparats wurde an 12 Riboflavinmangelmutanten geprüft. Einzelne Mutanten wuchsen bei hohen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinkonzentrationen (30 - 100 mg/l). Am besten wuchs die

Mutante HK 843, bei der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin 4-5 % der Wirksamkeit des Riboflavins aufwies.

3.1.3. Nachweis von 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin

Es ist bekannt, dass das 8-ständige Kohlenstoffatom des Purinvorläufers im Verlauf der Riboflavinbiosynthese abgespalten wird. Als Folgeprodukte der Ringöffnung waren Derivate des 4,5-Diaminopyrimidins zu erwarten. Diese Verbindungen sind erfahrungsgemäss äusserst labil. Sie reagieren jedoch sehr leicht mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zu Pteridinen, die stabiler sind und sich ausserdem durch ihre Fluoreszenz leicht nachweisen lassen.



Tatsächlich entstehen fluoreszierende Produkte, wenn gewisse Mutanten in glyoxal- oder diacetylhaltigem Minimalmedium inkubiert werden. Auf Grund der Fluoreszenzentwicklung in diacetylhaltigem Minimalmedium können drei Mutantengruppen unterschieden werden: a) Mutanten mit gelb fluoreszierendem Medium, b) mit dunkelgrün fluoreszierendem Medium und c) ohne Fluoreszenz. Die Mutante HK 645 gehört der Gruppe a) an und akkumuliert 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin, welches durch die folgenden Versuche nachgewiesen wurde.

a) 8-Ribityllumazin nach Inkubation mit Glyoxal.
Wird die Mutante HK 645 nach Vorzüchtung in glyoxalhaltigem Minimalmedium inkubiert, so erhält man eine grün fluoreszierende Lösung. Das von Zellen befreite Medium wurde chromatographisch aufgearbeitet, wie für 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin beschrieben. Die erhaltene gelbe, in Lösung grün fluoreszierende Substanz wurde durch UV-Spektroskopie und vergleichende Dünnschichtchromatographie als 8-Ribityllumazin identifiziert (Schema 1, Tab. 1,2).

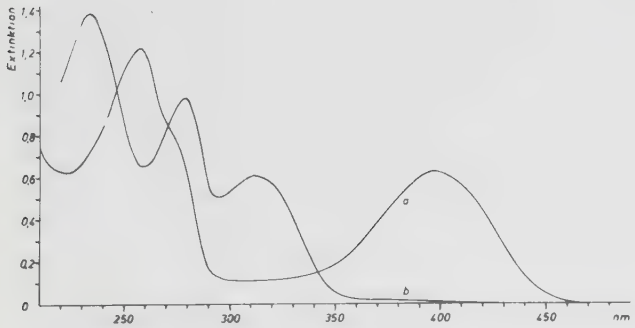


Abb. 1. UV-Spektrum von 8-Ribityllumazin aus HK 645;
a) p_H = 7, b) p_H = 13

b) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und Riboflavin nach Inkubation mit Diacetyl.
Inkubiert man die Mutante HK 645 in diacetylhaltigem Minimalmedium, so erhält man eine gelb fluoreszierende Lösung. Das von Zellen befreite Medium wurde im Vakuum

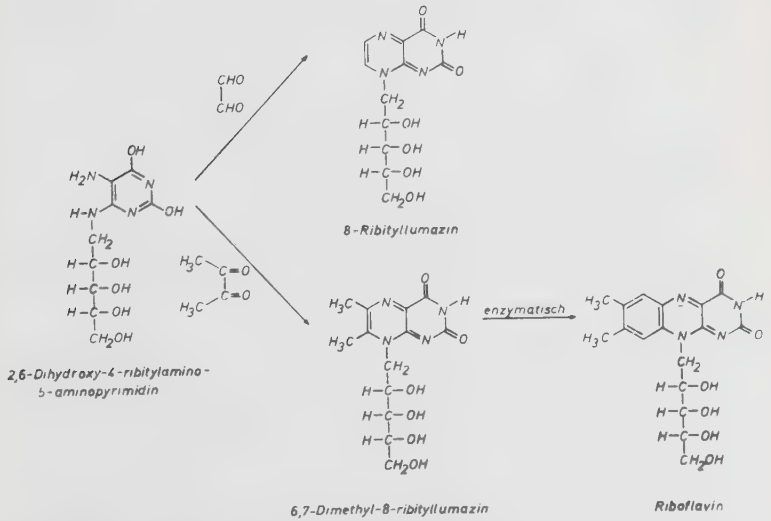
eingeengt und auf eine Säule aus Dowex 50 gegeben. Mit deion. Wasser liess sich eine grün fluoreszierende Substanz eluieren. Anschliessend wurde mit 0,05 N HCl eine gelb fluoreszierende Substanz eluiert. Die grün fluoreszierende Substanz konnte nach Rechromatographie, wie oben beschrieben, durch UV-Spektroskopie und vergleichende Dünnschichtchromatographie als 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin identifiziert werden (Tab. 1,2). Die gelb fluoreszierende Substanz wurde durch Chromatographie an saurem Aluminiumoxid und an Dowex 50 weiter gereinigt und auf Grund ihres UV-Spektrums und der R_f-Werte als Riboflavin identifiziert. Sie fördert das Wachstum von Lactobacillus casei in riboflavinfreiem Medium. Die biologische Bestimmung mit Hilfe von Lactobacillus casei (29) und die Messung der Extinktion bei 445 nm ergaben in guter Übereinstimmung die Bildung von 0,04 bzw. 0,05 mg Riboflavin pro Liter Minimalmedium. Da bei der beschriebenen Aufarbeitungsmethode beträchtliche Substanzverluste nicht zu vermeiden sind, ist die tatsächlich gebildete Riboflavinmenge noch grösser. Weder der Wildstamm noch die Mutante HK 859 produzieren unter den Versuchsbedingungen nachweisbare Mengen Riboflavin.

c) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin allein erhält man, wenn man die Mutante HK 645 ungefähr 8 Stunden in Minimalmedium inkubiert und anschliessend das von Zellen befreite Medium nach Zusatz von Diacetyl bei 30° über Nacht stehen lässt. Man erhält dann eine grün fluoreszierende Lösung, aus der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin wie beschrieben isoliert werden kann. Riboflavin liess sich nicht nachweisen. Daraus folgt, dass das im Versuch b) gefundene Riboflavin durch Beteiligung der Hefezellen und nicht durch chemische Reaktion von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin mit Diacetyl entstanden ist.
Die Ergebnisse der beschriebenen Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

zugesetzte Dicarbonylverbindung (g/l)				Fluoreszenz	isolierte Akkumulate
während der Akkumulation		nach der Akkumulation			
-		-		keine	-
Glyoxal	0,3	-		grün	8-Ribityllumazin
Diacetyl	0,6	-		gelb	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Riboflavin
-	,	Diacetyl	0,6	grun	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin

Tab.3. Akkumulationsprodukte der Mutante HK 645 nach Zusatz von Dicarbonylverbindungen

Aus diesen Befunden folgt, dass die Mutante 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin akkumuliert, welches mit den zugesetzten Dicarbonylverbindungen gemäss Schema 1 reagiert. Das durch Kondensation mit Diacetyl entstandene 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin kann von den Zellen zu Riboflavin weiter umgesetzt werden.



Schema 1

3.1.4. Wachstumswirkung von Diacetyl

Die vorstehenden Versuche haben gezeigt, dass die Mutante HK 645 durch Zusatz von Diacetyl zur Bildung von Riboflavin befähigt wird, d.h. dass der genetische Block der Mutante durch Diacetyl überbrückt werden kann. Um zu prüfen, ob die Mutante auch mit Diacetyl anstelle von Riboflavin wachsen kann, wurden Röhrchen mit diacetylhaltigem Minimalmedium mit einer dünnen Suspension von Hefezellen beimpft. Nach 3 Tagen wurde das Wachstum durch Trübungsmessung ermittelt (Abb.2). Die Mutante wächst gut bei Diacetylkonzentrationen von 3 - 30 mg/l. Bei grösseren Konzentrationen wird das Wachstum durch die toxischen Nebenwirkungen des Diacetyls gehemmt. Acetoin wurde gleichfalls geprüft und erwies sich als unwirksam.

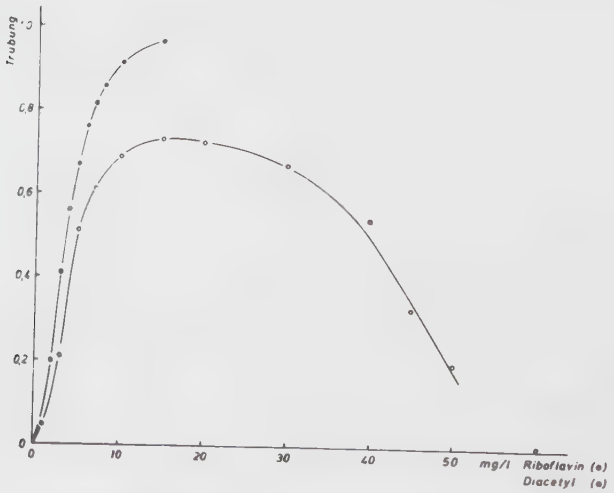


Abb. 2. Wachstum der Mutante HK 645 mit Diacetyl bzw. Riboflavin

3.1.5. Nachweis von 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxy-pyrimidin. Isolierung und Strukturaufklärung von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin

Wird die Mutante HK 859 in diacetylhaltigem Minimalmedium inkubiert, so erhält man eine im UV-Licht dunkelgrün fluoreszierende Lösung. Bei Inkubation ohne Diacetyl ist nur eine ganz schwache Blaufluoreszenz des Medium zu beobachten. Versetzt man jedoch die ohne Diacetyl gewonnene und von Zellen befreite Akkumulationslösung mit Diacetyl, so tritt nach einigen Stunden die charakteristische dunkelgrüne Fluoreszenz auf.

Die grün fluoreszierende Verbindung wird von Magnesiumsilikat quantitativ adsorbiert und kann leicht mit Aceton/Ammoniak eluiert werden. Chromatographiert man das so erhaltene Rohprodukt an einer Zellulose-Dünnschichtplatte mit 3 % Ammoniumchloridlösung als Fliessmittel, so beobachtet man im UV-Licht fluoreszierende Flecke, die vorläufig als Substanzen I - V bezeichnet werden (Tab.4).

Substanz	R_f	Fluoreszenz	Struktur
I	0,83	dunkelgrün	4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin
II	0,61	dunkelblau	?
III	0,51	hellblau	2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin
IV	0,36	gelb	Riboflavin
V	0,26	grün	2,6-Diamino-4-hydroxypteridin

Tab.4. Fluoreszierende Akkumulationsprodukte von HK 859 bei Zusatz von Diacetyl. R_f-Werte an Zellulose MN 300/ 3 % NH_4Cl.

Die Substanzen II - V werden auch in diacetylfreien Akkumulationsansätzen beobachtet. Substanz I verursacht

demnach die Grünfluoreszenz des diacetylhaltigen Mediums. Sie wurde als 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin identifiziert (s.u.).

"Substanz II" wurde bei der Rechromatographie in anderen Laufmitteln in mehrere blau fluoreszierende Komponenten zerlegt, die nicht weiter untersucht wurden.

Die Substanzen III und V wurden als 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin und 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin identifiziert (s.u.).

Substanz IV erwies sich als Riboflavin; dieses tritt hier im Akkumulat auf, weil die Zellen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen nach der Vorzüchtung nicht gewaschen wurden.

Die Reinigung von Substanz I wurde durch ihre extreme Empfindlichkeit gegen Licht und Sauerstoff sehr erschwert. Im Verlauf der Untersuchung zeigte es sich, dass das Hydrochlorid wesentlich stabiler ist als (I) selbst. Da (I) im Akkumulat nur in minimalen Mengen enthalten ist, mussten grosse Mengen an Ausgangsmaterial (insgesamt ca. 1200 l Akkumulatlösung) aufgearbeitet werden.

Zur Gewinnung von Akkumulatlösung wurde die Mutante in einem 100-Liter-Fermentor angezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem Minimalmedium unter Zusatz von Diacetyl suspendiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugieren entfernt und das Medium im Dunkeln mit Wasserstrahlvakuum über eine Säule aus Magnesiumsilikat gesaugt. Die fluoreszierenden Substanzen wurden mit Aceton/Ammoniak eluiert und eingeengt. Der erhaltene, braune Sirup wurde in Wasser aufgenommen und auf eine Säule aus Dowex 50, Na^+-Form, gegeben. Die Substanzen III und V liessen sich mit deion. Wasser, Substanz I mit Phosphatpuffer eluieren. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch ausgetestet. Substanz I wurde durch Säulenchromatographie an CM-Sephadex C-25 und durch Dünnschichtchromatographie an saurem Aluminiumoxid weiter gereinigt. Die wässrige

Lösung der reinen Substanz wurde mit HCl angesäuert und lyophilisiert. Es wurden etwa 3 mg einer gelben, sehr hydrophilen Substanz erhalten. Die wässrige Lösung fluoresziert intensiv grün. Die Fluoreszenz wird bei Zusatz von Säure stark geschwächt und verschwindet beim Zusatz starker Basen vollständig. Die Substanz besitzt stark basischen Charakter: Sie kann mit verdünnter Säure nicht von Dowex 50 eluiert werden und wandert bei der Membran-Elektrophorese in Pufferlösungen mit p_H-Werten unter 9,5 zur Kathode. Die Wanderungsrichtung wird durch Zusatz von Borat umgekehrt, was auf die Anwesenheit von mindestens zwei benachbarten, aliphatischen Hydroxylgruppen schliessen lässt.

Die freie Base wird durch Sonnenlicht rasch zersetzt. Die Lösung wird dabei entfärbt, und die Fluoreszenz wechselt von grün nach blau. Bei hinreichender Konzentration der Ausgangslösung fallen kleine, farblose Kristalle aus. Diese wurden durch Zentrifugation isoliert und konnten durch ihr IR-Spektrum und durch vergleichende Dünnschichtchromatographie als 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin (Tab.2, Abb. 3) identifiziert werden (s.Schema 3).

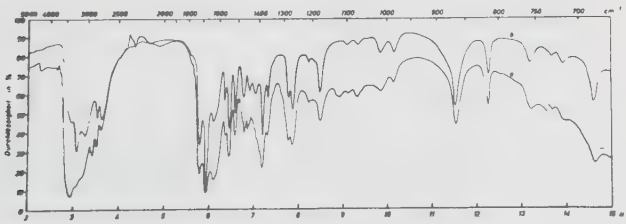


Abb.3. IR-Spektren von 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin a) durch Photozerfall von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin aus HK 859, b) synthetisch

Beim Erhitzen von Substanz I in 5N HCl (115°C, 18 Stunden) unter Luftabschluss entstand als Hauptprodukt 6,7-Dimethyllumazin, welches dünnschichtchromatographisch identifiziert wurde (Tab.2).

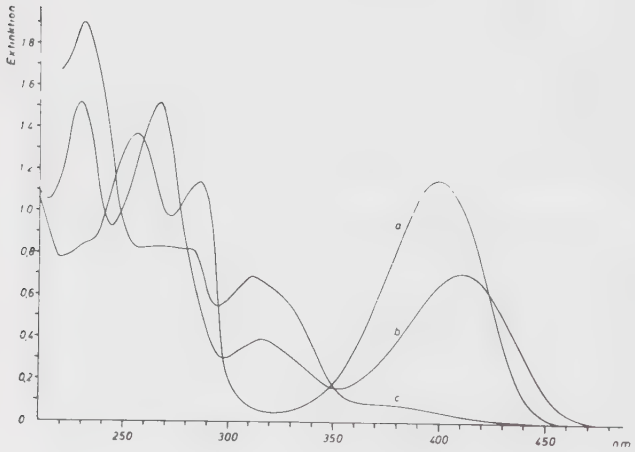


Abb.4. UV-Spektren von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin aus HK 859; a) p_H = 1, b) p_H = 7, c) p_H = 13

Die UV-Spektren von (I) zeigten grosse Ähnlichkeit mit 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7,8-trimethylpteridin. Daraus konnte man folgern, daß (I) ein 8-substituiertes Derivat des 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridins darstellt. Da der 8-Substituent unter hydrolysierenden Bedingungen abgespalten werden kann, konnte ein 8-Glykosid vermutet werden. Diese Annahme war jedoch nicht mit der auffallenden Ähnlichkeit der Massenspektren von (I) und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin vereinbar (Abb.5). Das Spektrum von (I)

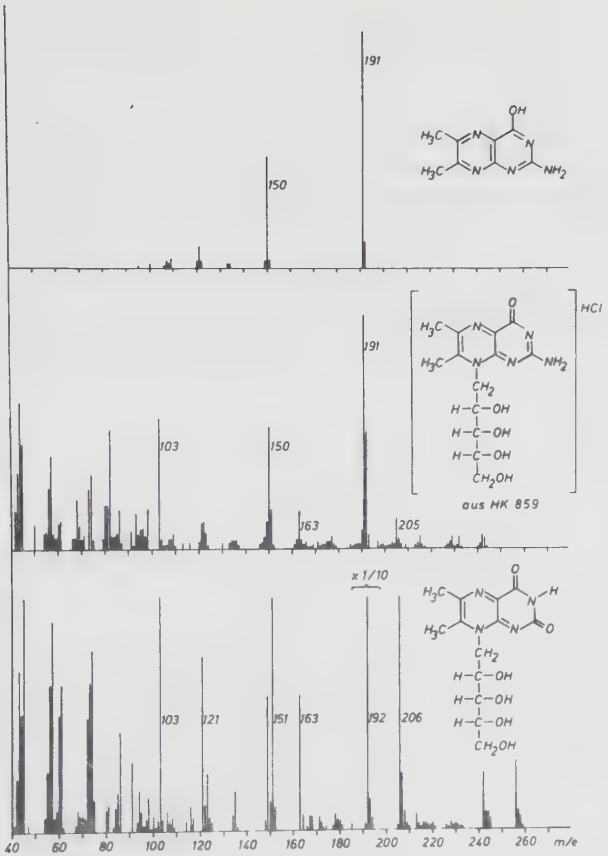
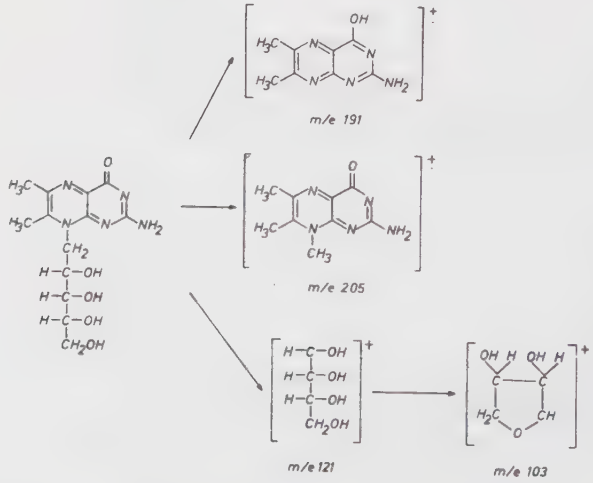


Abb.5. Massenspektren von 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin (oben), 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridinhydrochlorid aus HK 859 (Mitte), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (unten). Ionisierungsenergie 16 eV.

weist keinen Molekülpeak auf. Ein intensiver Peak bei m/e = 191 entspricht der Bildung von 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin durch vollständige Abspaltung des 8-Substituenten (Schema 2). Ein Peak bei m/e = 205 machte die Bildung von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7,8-trimethylpteridin wahrscheinlich. Ein intensiver Peak bei m/e = 103 war den Spektren von (I), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und Riboflavin gemeinsam. Die Vermutung, dass es sich hierbei um ein Fragment des Ribitylrestes handeln könnte, wurde durch weitere Messungen an 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin bestätigt: Eine Hochauflösungsmessung ergab die Zusammensetzung $C_4H_7O_3$; bei Deuterierung durch Lösen in D_2O wurde das Fragment um 2 Masseneinheiten schwerer, was auf die



Schema 2. Zerfallsreaktionen von 2-Amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridinhydrochlorid im Massenspektrometer.

Anwesenheit von 2 Hydroxylgruppen schliessen liess. Dem Fragment m/e = 103 kann somit die Struktur eines 3,4-Dihydroxytetrahydrofurylkations beigelegt werden. Aus diesen Ergebnissen kann für (I) die Struktur 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-(2', 3', 4', 5'-tetranydroxypentyl)-pteridin abgeleitet werden. Da weiterhin auch die optischen Rotationsspektren (Abb. 6 a,b) von (I) und 6,7-Dimethyl-8-(D-ribityl)-lumazin in 0,1 N HCl sehr ähnlich sind, war anzunehmen, dass (I) eine D-Ribitylverbindung darstellt.

4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-(D-ribityl)-pteridin wurde synthetisiert (51) und zeigte dieselben UV-, IR- und optischen Rotationsspektren sowie R_f-Werte wie die aus HK 859 isolierte Verbindung (Abb.6,7, Tab.1,2).

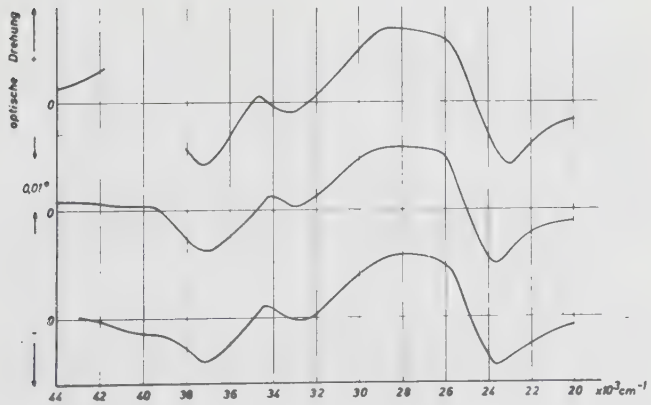


Abb.6a. Optische Rotationsspektren von 6,7-Dimethyl-8-(D-ribityl)-lumazin (oben) und 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-(D-ribityl)-pteridin aus HK 859 (Mitte) bzw. synthetisch (unten) in 0,1 N HCl.

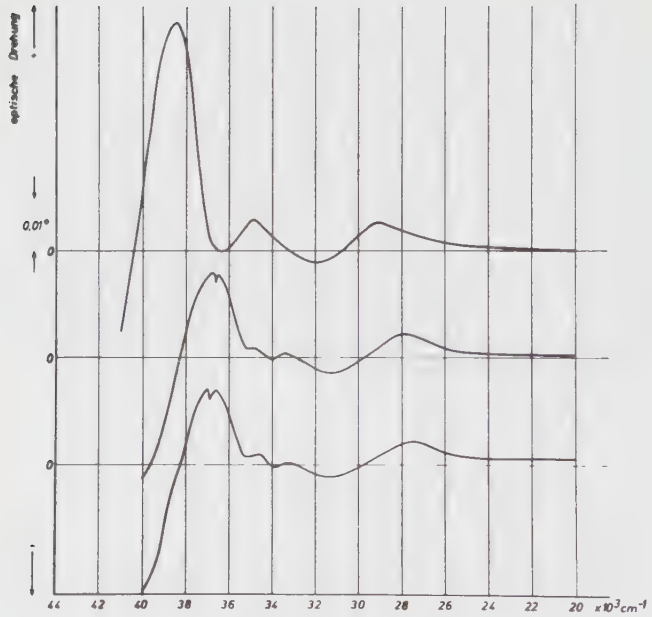


Abb.6b. Optische Rotationsspektren von 6,7-Dimethyl-8-(D-ribityl)-lumazin (oben) und 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-(D-ribityl)-pteridin aus HK 859 (Mitte) bzw. synthetisch (unten) in 0,1 N NaOH.

Da (I) durch Reaktion eines akkumulierten Pyrimidinderivates mit Diacetyl entstanden ist, ist zu folgern, daß die Mutante HK 859 2,5-Diamino-4-(D-ribitylamino)-6-hydroxypyrimidin produziert (Schema 3). Die Annahme liegt nahe, dass es sich hierbei um das biogenetische Vorprodukt des oben beschriebenen 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidins (s.Schema 1) handelt.

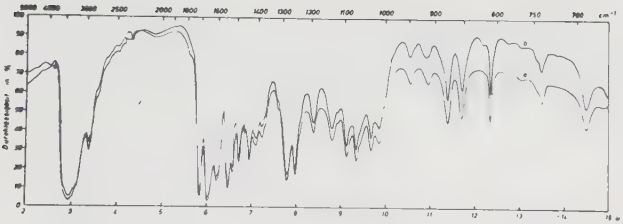
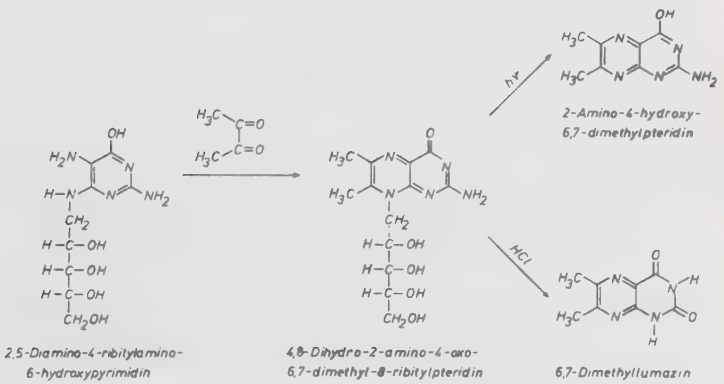


Abb.7. IR-Spektren von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridinhydrochlorid a) aus HK 859 b) synthetisch



Schema 3.

3.1.6. Isolierung von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-pteridin

Die oben beschriebene Substanz III (s.Tab.4) wurde durch Chromatographie an Dowex 50 gereinigt (Abb.8) und anschliessend aus Wasser umkristallisiert.

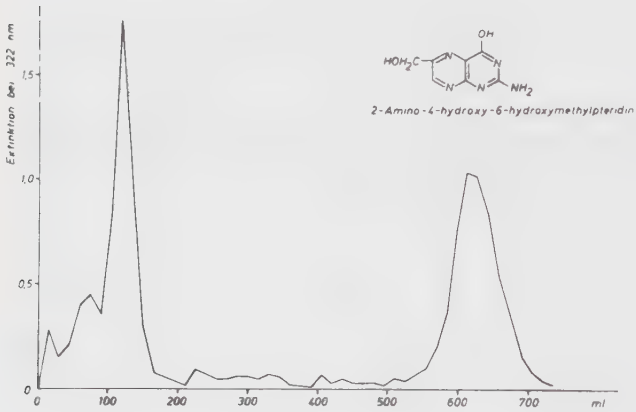


Abb.8. Chromatographie von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin. Säule aus Dowex 50 Wx8, 200-400 mesh, 1,5 x 25 cm, H^+-Form, Elution mit N HCl.

Die Substanz löst sich schlecht in Wasser, gut hingegen in verdünnten Alkalien. Die wässrige Lösung fluoresziert intensiv hellblau. Die Fluoreszenz wird durch Zusatz von Ammoniak verstärkt.

Auf Grund des UV-Spektrums (Abb.9) und der charakteristischen Blaufluoreszenz konnte angenommen werden, dass (III) ein Derivat des 2-Amino-4-hydroxypteridins darstellt. Bei der Oxydation von (III) mit alkalischem Permanganat erhält

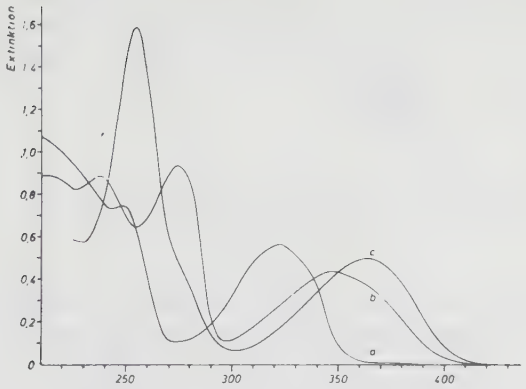


Abb.9. UV-Spektren von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-pteridin; a) p_H = 1, b) p_H = 7, c) p_H = 13

man 2-Amino-4-hydroxypteridin-6-carbonsäure, welche durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit einem synthetischen Präparat identifiziert wurde. Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit bekannten Pteridinderivaten konnte (III) als 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin identifiziert werden. Diese Struktur wurde durch UV- und IR-Spektren bestätigt (Abb.10, Tab.1,2). Die Substanz wird unter den angewandten Versuchsbedingungen auch vom Wildstamm S 288 C und von anderen Mutanten abgegeben.

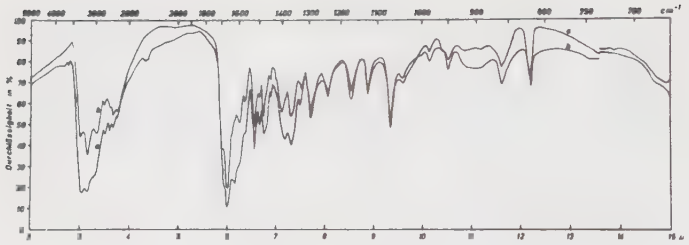


Abb.10. IR-Spektren von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin a) aus HK 859, b) synthetisch.

3.1.7. Isolierung von 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin

Die Abtrennung von Substanz V aus dem Rohakkumulat der Mutante HK 859 wurde oben beschrieben. (V) wurde durch Chromatographie an SE-Sephadex C-25 und Dowex 50 gereinigt und anschliessend aus Wasser umkristallisiert.

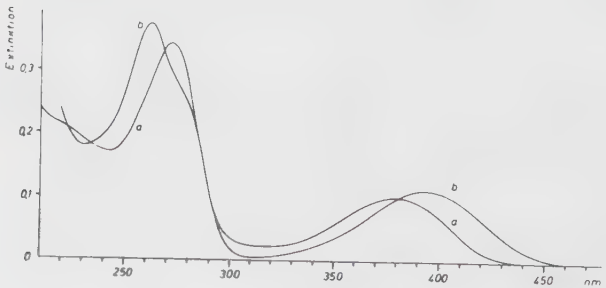
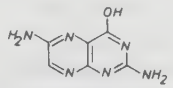


Abb.11. UV-Spektren von 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin aus HK 859; a) p_H = 1, b) p_H = 13.

Die Substanz konnte auf Grund ihres UV-Spektrums (Abb. 11) und durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit einem synthetischen Präparat als 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin erkannt werden.



2,6-Diamino-4-hydroxypteridin

3.1.8. Wachstumsversuche mit Ribitylaminopyrimidinen

Da man annehmen kann, dass die oben nachgewiesenen Pyrimidinabkömmlinge Zwischenprodukte der Riboflavinbiosynthese sind, wurde geprüft, ob an anderer Stelle blockierte Mangelmutanten damit wachsen können. Alle Teste verliefen negativ. Das mag zum Teil an der geringen Stabilität der untersuchten Pyrimidine liegen, die unter den Versuchsbedingungen in wenigen Stunden zu mehreren, teilweise intensiv fluoreszierenden Produkten umgewandelt werden, während andererseits die Hefezellen wenigstens zwei bis drei Tage zum Wachstum benötigen. Deshalb wurde in weiteren Versuchen den Teströhrchen alle 4 Stunden frisches, steriles 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin zugesetzt, um das durch Zerfall verlorene zu ersetzen. Auch bei diesen Versuchen liess sich kein Wachstum feststellen.

3.1.9. Isolierung weiterer Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae

Weitere Riboflavinmutanten wurden gemeinsam mit O. Oltmanns isoliert, um zu prüfen, ob noch andere als die bisher beschriebenen Akkumulate auftreten können, und um für die

geplante genetische Analyse der Riboflavinmangelmutanten eine möglichst große Anzahl von Vertretern bereitzustellen. Mutationen wurden durch Behandlung des haploiden Hefewildstamms S 288 C mit Methansulfonsäureäthylester nach der von Oltmanns und Lingens (28) beschriebenen Methode ausgelöst. Nach der Mutagenbehandlung wurden die Zellen auf Komplettagar plattiert und 3-6 Tage inkubiert. Dann wurden Proben einzelner Kolonien mit der Platinöse auf Minimalagar und auf Riboflavin-Agar ausgestrichen. Isolierungen, die nur auf Riboflavin-Agar wuchsen, wurden durch weitere Strichteste und durch Blättchentest überprüft. Unter ca. 16000 Kolonien befanden sich 13 Riboflavinmangelmutanten. Die Mutanten gehörten sämtlich den bereits bekannten biochemischen Gruppen an.

3.1.10. Einfaches Verfahren zur biochemischen Klassifizierung von Riboflavinmangelmutanten

Die bisher bekannten Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae können in vier Gruppen eingeordnet werden, je nachdem sie

a) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin
b) 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin
c) 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin
d) kein nachweisbares Akkumulat

produzieren. Die oben beschriebenen Eigenschaften können dazu benutzt werden, die Gruppenzugehörigkeit von Riboflavinmangelmutanten durch Versuche in kleinstem Maßstab zu ermitteln. Dazu wurden Akkumulationsversuche mit und ohne Diacetyl und Wachstumsversuche mit Diacetyl ausgeführt. Folgende Eigenschaften wurden zur Charakterisierung herangezogen:

ad a) Die Mutanten akkumulieren in einfachem wie auch in diacetylhaltigem Minimalmedium ein grün fluoreszierendes Produkt.

ad b) Bei Inkubation in diacetylhaltigem Minimalmedium tritt Gelbfluoreszenz auf. Die Mutanten wachsen mit Diacetyl.

ad c) Mit Diacetyl dunkelgrüne Fluoreszenz.

ad d) Keine Fluoreszenz.

Gruppe	Akkumulat	Mutanten				
a	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	HK 750	HK 793	HK 873	HK 878	HK 886
b	2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin	HK 645 HK 880 HK 911	HK 693 HK 882	HK 812 HK 890	HK 829 HK 900	HK 871 HK 910
c	2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxy-pyrimidin	HK 660	HK 857	HK 859	HK 877	
d	-	HK 761 HK 902	HK 843 HK 907	HK 851	HK 858	HK 899

Tab.5. Biochemisches Verhalten von 27 untersuchten Riboflavinmangelmutanten

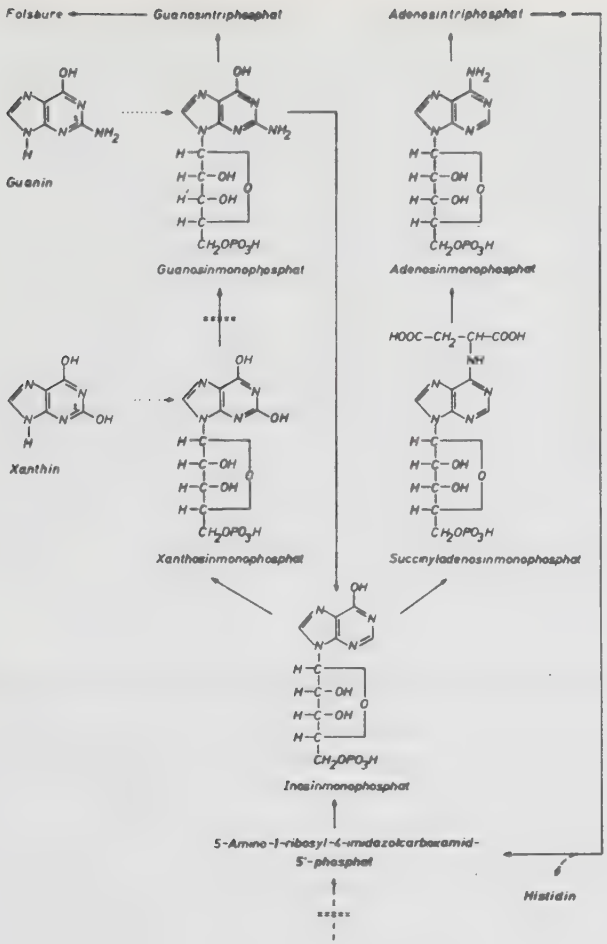
Zur Durchführung der Akkumulationsversuche wurden die Mutanten in Zentrifugenröhrchen mit Komplettmedium angezüchtet, mit Salzlösung gewaschen und über Nacht in Minimalmedium bzw. diacetylhaltigem Minimalmedium inkubiert. Dann wurden die Zellen auf den Gläschenboden zentrifugiert und der Überstand im UV-Licht betrachtet. Wachstumsversuche wurden mit einer Standardkonzentration von 10 mg/l Riboflavin bzw. Diacetyl ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 enthalten. Die Mutanten HK 857 und HK 877 weisen das sog. Leaky-Phänomen auf, d.h. sie wachsen mit Verzögerung auch in unsubstituiertem Minimalmedium. Die Ergebnisse des beschriebenen Schnelltests wurden in 8 Fällen durch dünnschichtchromatographische Untersuchung der Akkumulate geprüft. Es wurden keine Abweichungen beobachtet.

3.2. Untersuchungen an Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes. Nachweis des Verzweigungspunktes von Purin- und Riboflavinbiosynthese.

Obwohl seit langem bekannt ist, dass die Biosynthese des Riboflavins vom Syntheseweg der Purine abzweigt, konnte bisher nicht ermittelt werden, an welcher Stelle die Abzweigung erfolgt. Die strukturelle Ähnlichkeit des von uns isolierten 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidins mit Guanin machte eine Guaninverbindung als Ausgangspunkt der Riboflavinbiosynthese wahrscheinlich.

Die einzelnen Purinverbindungen können in Mikroorganismen leicht ineinander umgewandelt werden. Hierfür existiert ein engmaschiges Netzwerk von Stoffwechselwegen. Um die Ausgangsverbindung der Riboflavinbiosynthese durch Isotopeneinbauversuche zu bestimmen, muss man die Umwandlungsmöglichkeiten der Purinverbindungen durch Mutationen einschränken. Für derartige Untersuchungen eignen sich nur Mikroorganismen, die Riboflavin in genügender Menge produzieren und deren Purinstoffwechsel genau untersucht ist. Diese Voraussetzungen treffen am ehesten bei dem Bakterium Aerobacter aerogenes zusammen. Bei der Suche nach einem Aerobacter-Stamm, der viel Riboflavin abgibt, erwies sich die von Gibson (31) isolierte, polyauxotrophe Mutante 62-1 als besonders günstig. Diese Mutante, die zum Wachstum auf die Zufuhr von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan angewiesen ist, produziert bis zu 2 mg/l Riboflavin, wenn die vorgezüchteten und gewaschenen Zellen unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden.

Der Purinstoffwechsel von Aerobacter aerogenes ist von Magasanik und Karibian (32) eingehend untersucht worden. Die hier interessierenden Reaktionen sind in Schema 4 enthalten. Die Biosynthese der Purine beginnt beim Ribosylaminphosphat und führt über mehrere Zwischenstufen zum Inosinmonophosphat. Aus Inosinphosphat entsteht einerseits



Schema 4. Stoffwechselwege der Purine in Aerobacter aerogenes und genetische Defekte der Mutante 62-1 AB.

Adenosinphosphat und andererseits Xanthosinphosphat und Guanosinphosphat. Diese Umwandlungen verlaufen irreversibel. Adenosinphosphat und Guanosinphosphat können jedoch durch andere Enzyme in Inosinphosphat zurückverwandelt werden. Aus den Monophosphaten werden die jeweiligen Triphosphate gebildet. Exogene Purinbasen können durch Phosphoribosyltransferasen in die entsprechenden Mononukleotide überführt werden. Um zu prüfen, ob die Riboflavinbiosynthese auf der Stufe einer Xanthin- oder aber einer Guaninverbindung beginnt, kann man Mutanten benutzen, die Xanthosinphosphat nicht mehr in Guanosinphosphat umwandeln können. Derartige Mutanten akkumulieren Xanthosin, welches durch Dephosphorylierung aus Xanthosinphosphat gebildet wird. Sie sind auf die Zufuhr von Guanin oder Guaninverbindungen angewiesen, da sie diese noch ineinander umwandeln, aber nicht mehr selbst synthetisieren können. Ausserdem empfiehlt es sich, einen zusätzlichen Block im Grundzweig der Purinbiosynthese anzulegen, um die de novo-Synthese von Purinen zu verhindern.

3.2.1. Isolierung von Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes

Zunächst wurden Mutanten mit einem genetischen Block im Grundzweig der Purinbiosynthese isoliert. Davon ausgehend wurden Mutanten mit einem zusätzlichen Block zwischen Xanthosinphosphat und Guanosinphosphat erhalten.

Log-Phasen-Zellen der Mutante 62-1 wurden in Citrat-Phosphat-Puffer (p_H = 6) mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin behandelt. Nach Zwischenzüchtung in Komplettmedium wurden die Zellen auf Komplettmedium plattiert und nach Inkubation über Nacht auf Minimalmedium und auf Guanin-Minimalmedium gestempelt. Isolierungen, die nur auf Guanin-Medium wuchsen, wurden durch Strichtest und Blättchentest

weiter untersucht. Es wurden fünf guaninbedürftige Mutanten erhalten, von denen vier auch mit Xanthin wuchsen und demnach im Grundzweig blockiert waren. Unter den letzteren produzierte die Mutante 62-1 A am meisten Riboflavin und wurde deshalb für die weiteren Versuche benutzt.

Zellen der Mutante 62-1 A wurden wie beschrieben mit Mutagen behandelt, nach Zwischenzüchtung auf Komplettmedium plattiert und anschliessend auf Hypoxanthin-Minimalmedium und Guanin-Minimalmedium gestempelt. Isolierungen, die nur auf Guanin-Medium wuchsen, wurden durch Strichtest und Blättchentest weiter untersucht. In mehreren Versuchen wurden 13 Mutanten isoliert, von denen 7 auch mit Xanthin wuchsen und folglich einen genetischen Block zwischen Inosinphosphat und Xanthosinphosphat aufwiesen. Die restlichen 6 waren zwischen Xanthosinphosphat und Guanosinphosphat blockiert. Unter diesen produzierte die Mutante 62-1 AB am meisten Riboflavin. Sie wurde für die weiteren Versuche benutzt.

3.2.2. Einbau radioaktiv markierter Purine in Riboflavin und Xanthosin

Die Mutante 62-1 AB wurde von einem frischen Schrägröhrchen in einen Erlenmeyerkolben mit Komplettmedium geimpft und bei 37° geschüttelt, bis die Extinktion einer steril entnommenen Probe den Wert 1,35 erreicht hatte. Das war i.A. nach ca. 18 Stunden der Fall. (Ist die Kultur zu jung, so akkumulieren hinterher die Zellen kein Riboflavin, ist sie hingegen zu alt, so wird viel Riboflavin und kein Xanthosin gebildet.) Die Zellen wurden nach Waschen mit Salzlösung in sterilem Minimalmedium suspendiert, dem Purine gemäss Tab.7 zugesetzt wurden. Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und aus dem Medium Riboflavin und Xanthosin durch Adsorption an Magnesiumsilikat bzw. Aktivkohle isoliert. Riboflavin wurde

durch Chromatographie an CM-Sephadex C-25, Dowex 50 und Sephadex G-10 gereinigt, bis sich die spezifische Aktivität nicht mehr veränderte. Xanthosin wurde durch Chromatographie an Dowex 50 (Abb.12) und an Sephadex G-10 in reiner Form erhalten. Die radiochemische Reinheit der isolierten Verbindungen wurde durch Radiodünnschichtchromatographie in 4 Laufmitteln geprüft. Die R_f-Werte der isolierten Verbindungen sind in Tab.6 angegeben.

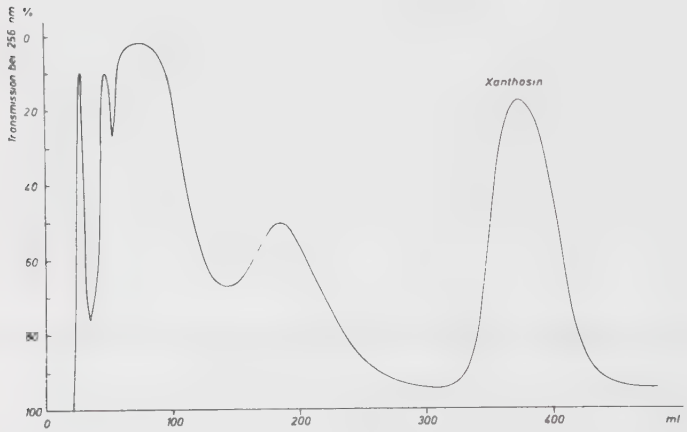


Abb.12. Chromatographie des Akkumulatgemisches aus 62-1 AB an Dowex 50. Säule aus Dowex 50 Wx8, 200 - 400 mesh, H^+-Form, 1,5 x 27 cm, Elution mit 0,05 N HCl.

Die spezifische Aktivität der isolierten Verbindungen wurde durch Extinktionsmessung und Szintillationszählung bestimmt. Zur Szintillationszählung wurde der emulgierende Szintillator nach Patterson und Greene (33) benutzt. Die Szintillationsmessungen wurden durch interne Standardisierung

	I	II	III	IV
Riboflavin	0,26	0,24	0,17	0,08
Xanthosin	0,54	0,52	0,17	0,16

I 3% NH_4Cl
II 0,1N Na-Boratpuffer $p_H = 8$
III n-Butanol / Eisessig / Wasser 60 15 25
IV iso-Propanol / konz Ammoniak / Wasser 60 2 38

} Zellulose MN 400

Tab.6. R_f-Werte von Riboflavin und Xanthosin

mit 2-^{14}C-Guanin korrigiert. Die beobachteten Quencheffekte blieben in engen Grenzen.

Die Ergebnisse von Versuchen mit 2-^{14}C-Xanthin und 2-^{14}C-Guanin sind in Tab.7 angegeben.

Versuch Nr.	zugesetzte Purine	mg/l	spez Akt (c/min µMol)	relative Aktivität (R A)	
				Riboflavin	Xanthosin
1	2-^{14}C-Xanthin	10,7	$1,35 \times 10^6$	0,3	51
	Adenin	5			
	Guanin	5			
2	2-^{14}C-Guanin	5	$1,23 \times 10^6$	89	1,6
	Adenin	5			
	Hypoxanthin	10			
	Xanthin	8			

$$R.A. = \frac{\text{spezifische Aktivität der isolierten Verbindung}}{\text{spezifische Aktivität der eingesetzten Verbindung}} \times 100$$

Tab.7. Einbau ^{14}C-markierter Purine in Riboflavin und Xanthosin durch Aerobacter aerogenes 62-1 AB

2-^{14}C-Xanthin wird in Xanthosin, aber nicht in Riboflavin eingebaut. Eine Xanthinverbindung kommt demnach als Aus-

gangsprodukt der Riboflavinbiosynthese nicht in Betracht. 2-^{14}C-Guanin wird ohne nennenswerte Verdünnung in Riboflavin umgewandelt. Dieser Befund bestätigt die Annahme, dass die Biosynthese des Riboflavins von einer Guaninverbindung ausgeht.

3.3. Isolierung von Candida guilliermondii-Mangelmutanten

Die untersuchten Mangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae akkumulieren Zwischenprodukte nur in sehr geringen Mengen, so dass deren Isolierung auf grosse Schwierigkeiten stösst. Gemeinsam mit O. Oltmanns wurde deshalb versucht, Riboflavinmangelmutanten von einem Organismus zu erzeugen, der grosse Mengen Riboflavin bildet, in der Hoffnung, Zwischenprodukte in grösserer Menge zu erhalten. Die Verwendung von Candida guilliermondii erschien vorteilhaft, weil dieser Organismus auch in Minimalmedium Riboflavin produziert, während die Mehrzahl der flavinogenen Pilze nur in komplexen Medien überschüssiges Riboflavin erzeugt. Mutationen wurden durch Behandlung mit Methansulfonsäureäthylester induziert (28). Die behandelten Zellen wurden auf Riboflavinkomplettmedium plattiert. Nach 3-5 Tagen wurden einzelne Kolonien auf Minimalmedium und Komplettmedium ausgestrichen. Isolierungen, die nur auf Riboflavinkomplettmedium wuchsen, wurden durch weitere Strichtests überprüft. Der Nährstoffbedarf von 130 Mutanten wurde von Oltmanns im Blättchentest überprüft. Die übrigen Mutanten wurden zur Prüfung auf Riboflavinbedürftigkeit auf Riboflavin-Minimalmedium ausgestrichen. Insgesamt wurden 449 Mutanten untersucht. Es wurden keine Riboflavinmangelmutanten gefunden.

4. Diskussion

Fünf von 27 untersuchten Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae akkumulieren in riboflavinfreiem Minimalmedium 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Plaut (23) hat gezeigt, dass diese Substanz das unmittelbare Vorprodukt des Riboflavins darstellt. Demnach sind die genannten 5 Mutanten im letzten Schritt der Riboflavinbiosynthese blockiert. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin fördert das Wachstum mancher früher blockierten Mutanten. Im günstigsten Fall (Mutante HK 843) werden 4 - 5 % der Wirksamkeit des Riboflavins erreicht. Hingegen wächst die Mutante HK 829 nicht mit 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, obwohl sie mit Diacetyl wächst, also vor dem letzten Schritt blockiert sein muss (s.u.). Korte und Aldag (34) fanden, dass 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin von zellfreien Extrakten aus Ashbya gossypii und Eremothecium ashbyii, aber nicht von intakten Zellen in Riboflavin umgewandelt wird. Dieser Befund und die schlechte Wachstumswirksamkeit bei Hefemutanten lassen darauf schliessen, dass die Substanz von den untersuchten Mikroorganismen schlecht aufgenommen werden kann. Möglicherweise ist der hohe Riboflavinbedarf unserer Mutanten dadurch bedingt, dass auch Riboflavin selbst schlecht aufgenommen wird. Wilson und Pardee (35) konnten zeigen, dass Escherichia coli kein Riboflavin aufnimmt. Dementsprechend sind Riboflavinmangelmutanten von E. coli bisher nicht aufgefunden worden.

Elf Riboflavinmangelmutanten akkumulieren 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin. Da diese Substanz äusserst labil ist und im Akkumulationsmedium nur in sehr geringer Konzentration vorliegt, wurde sie vor der Isolierung durch Behandlung mit Glyoxal bzw. Diacetyl in die entsprechenden Lumazinderivate umgewandelt. Bei dieser Kondensationsreaktion spielen die Hefezellen keine Rolle: Man erhält dieselben Produkte, wenn auch in geringer Aus-

beute, wenn man die Akkumulation in Abwesenheit der Dicarbonylverbindung vornimmt und anschliessend das zellfreie Medium mit der Dicarbonylverbindung behandelt. Die Umsetzung mit Glyoxal ist von Plaut (20) und Mitarbeitern zum Nachweis des als Nebenprodukt bei der Riboflavinsynthetase-Reaktion anfallenden 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidins benutzt worden.

Mutanten, die 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin akkumulieren, können mit Diacetyl anstelle von Riboflavin wachsen. Bei Verwendung der zum Wachstum benötigten Diacetylkonzentration tritt kein oder nur sehr wenig 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin im Medium auf. Oben wurde ausserdem gezeigt, dass die Zellen extrazelluläres 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin nur in hoher Konzentration verwerten können. Man muss daher annehmen, dass das von den Zellen gebildete 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin intrazellulär mit Diacetyl reagiert und das so gebildete 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin auf enzymatischem Wege zu Riboflavin weiter umgesetzt wird (Schema 1). Bei Verwendung toxischer Diacetylkonzentrationen wird das gebildete Riboflavin sogar in das Medium abgegeben.

2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin fördert das Wachstum von Riboflavinmangelmutanten nicht. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass die Substanz unter den Versuchsbedingungen mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden zerfällt, wie man leicht aus der Veränderung des UV-Spektrums ersehen kann, während andererseits die Hefen mehrere Tage zum Wachsen benötigen. Ausserdem werden die Pyrimidinderivate möglicherweise schlecht aufgenommen.

Katagiri und Mitarbeiter (36) haben die enzymatische Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin aus 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin und Acetoin durch Extrakte aus Ashbya gossypii und Eremothecium ashbyii beschrieben. Goodwin und Horton (17) gelang es hingegen nicht, die Pyrimidinverbindung durch Enzymextrakte aus

Candida flareri unter verschiedenartigsten Bedingungen umzusetzen. Plaut (23) nimmt an, dass die von Katagiri und Mitarbeitern benutzten Extrakte lediglich Acetoin zu Diacetyl dehydrierten, welches dann auf nicht-enzymatischem Wege mit 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin reagierte. Durch diese Annahme findet auch die von Katagiri und Mitarbeitern beschriebene, mangelnde Strukturspezifität der angeblichen Enzymreaktion ihre Erklärung.

In Anbetracht der erfolglosen Enzymversuche muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass nicht 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin, sondern ein Phosphorsäureester dieser Verbindung als Zwischenprodukt der Riboflavinbiosynthese auftritt. Entsprechende Fälle sind von der Biosynthese des Tryptophans und Histidins her bekannt: Die Biosynthese des Tryptophans z.B. führt über Indolylglycerinphosphat (37), als Akkumulat findet man jedoch nur Indolylglycerin (38). Dieses ist nicht wachstumwirksam.

Durch die Arbeiten von Plaut und Mitarbeitern (20) ist bekannt, dass 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin als Nebenprodukt beim letzten Schritt der Riboflavinbiosynthese entsteht. Man kann vermuten, dass dieses wieder in 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin umgewandelt wird. Andernfalls müsste der Wildstamm diese Substanz entweder ausscheiden oder abbauen. Spezielle Abbauwege scheinen indessen nicht zu existieren, da die Substanz ja von den untersuchten Mangelmutanten ausgeschieden wird. Es sind mehrere Beispiele dafür bekannt, dass Metaboliten einen solchen Kreisprozess durchlaufen. Beispielsweise beginnt die Biosynthese des Histidins beim Adenosintriphosphat und liefert als Nebenprodukt 5-Amino-1-ribosyl-4-imidazolcarboxamid-5'-phosphat, welches wieder in Adenosinphosphat umgewandelt werden kann (s.Schema 4).

Vier von unseren Hefemutanten akkumulieren 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin. Diese Substanz wurde

gleichfalls durch Abfangen mit Diacetyl stabilisiert. Für diese Kondensationsreaktion ist die Anwesenheit der Zellen ohne Bedeutung. Das Pyrimidinderivat ist nicht wachstumswirksam. Die möglichen Ursachen wurden oben diskutiert.

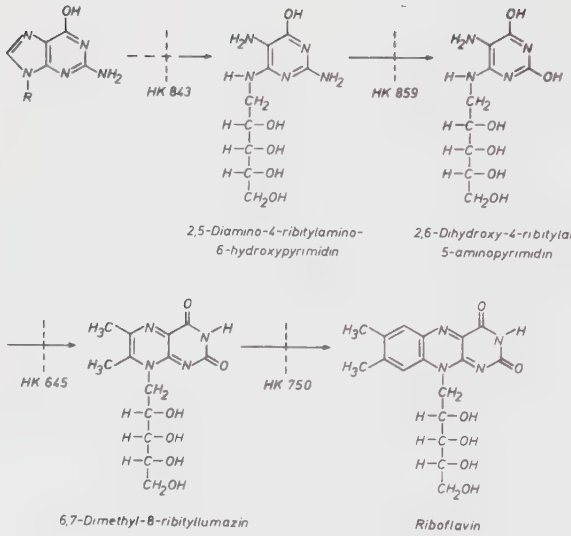
Bisher war unbekannt, an welcher Stelle die Biosynthese des Riboflavins vom Syntheseweg der Purine abzweigt. Goodwin und Treble (39) haben über den Nachweis von 2,6-Dihydroxy-4,5-diaminopyrimidin in Kulturen von Eremothecium ashbyii berichtet. Auf Grund dieser Beobachtung und der strukturellen Ähnlichkeit von Riboflavin und Xanthin wurde vielfach eine Xanthinverbindung als Muttersubstanz des Riboflavins angenommen (40). Wegen der Strukturähnlichkeit des von uns isolierten 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidins mit Guanin erschien jedoch eine Guaninverbindung als Ausgangsprodukt wahrscheinlicher. Zur Prüfung dieser Annahme wurde eine Mutante von Aerobacter aerogenes isoliert, die keine Purine mehr de novo synthetisieren und ausserdem Xanthinverbindungen nicht mehr in Guaninverbindungen umsetzen kann (s.Schema 4). Werden dem Medium Purine zugesetzt, so akkumuliert die Mutante Xanthosin und Riboflavin.

Die Mutante wurde in Minimalmedium unter Zusatz von 2-^{14}C-Guanin, Xanthin, Hypoxanthin, Adenin, Histidin und Tryptophan inkubiert (Tab.7). Der Zusatz von Xanthin, Hypoxanthin und Adenin sollte die Umwandlung von Guanin in Xanthosin einschränken. Histidin wurde zugesetzt, um die Enzyme der Histidinbiosynthese, die vom Adenosintriphosphat ausgeht, zu reprimieren (32). Tryptophan unterdrückt die Bildung von Anthranilsäure, die durch ihre Blaufluoreszenz die einfache Beurteilung der Riboflavinbildung beeinträchtigt. Unter diesen Versuchsbedingungen baut Riboflavin 89 % Radioaktivität aus 2-^{14}C-Guanin ein. Unter nahezu denselben Versuchsbedingungen wird 2-^{14}C-Xanthin nur zu 0,3 % in Riboflavin, hingegen zu 51 % in Xanthosin eingebaut.

Daraus geht eindeutig hervor, dass eine Xanthinverbindung nicht der Ausgangspunkt der Riboflavinbiosynthese sein kann. Adenin- und Hypoxanthinverbindungen können gleichfalls ausgeschlossen werden; Guanin kann zwar von der untersuchten Mutante in Adenin- und Hypoxanthinverbindungen umgewandelt werden (Schema 4); man müsste jedoch eine erhebliche Isotopenverdünnung erwarten für den Fall, dass das eingesetzte 2-^{14}C-Guanin vor der Umwandlung in Riboflavin einen Hypoxanthin- bzw. Adeninpool passiert, da ja das Medium unmarkiertes Adenin und Hypoxanthin enthielt. Dementsprechend wurde auch Xanthosin nur zu 1,5 % markiert. Die Isotopenversuche an Aerobacter aerogenes bestätigen also vollauf die aus den Akkumulationsstudien an Hefen gewonnene Vermutung, dass die Biosynthese des Riboflavins von einer Guaninverbindung ausgeht. Es bleibt offen, ob es sich hierbei um freies Guanin, ein Ribosid oder ein Ribotid handelt. Sicher ist, dass unter normalen Bedingungen die Stufe des Guanosinmonophosphats durchlaufen werden muss, da in Purin-autotrophen Organismen sämtliche anderen Guaninverbindungen einschliesslich der freien Base aus dieser Substanz gebildet werden.

Die Ergebnisse der Akkumulations- und Isotopeneinbauversuche sind im Biosyntheseschema 5 zusammengefasst. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die aufgeführten Pyrimidinderivate möglicherweise in Form der entsprechenden Phosphorsäureester umgesetzt werden. Unbekannt ist bisher, über welche Zwischenstufen die Bildung des ersten fassbaren Zwischenprodukts, 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin, aus einer Guaninvorstufe erfolgt. Man kann jedoch vermuten, dass ähnliche Reaktionen wie bei den Biosynthesen der Folsäure und des Toxoflavins ablaufen.

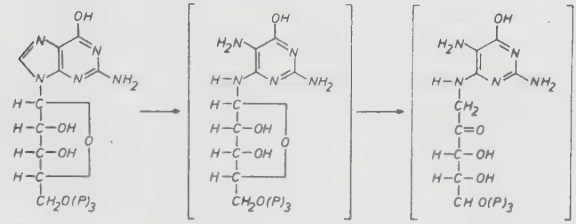
Brown und Mitarbeiter (41,42) konnten durch enzymatische Untersuchungen nachweisen, dass die Folsäurebiosynthese vom Guanosintriphosphat ausgeht. Shiota und Mitarbeiter (43) haben die Ringöffnung auf rein chemischem Wege durch Be-



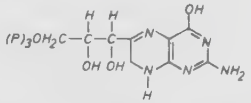
Schema 5. Zwischenprodukte der Riboflavinbiosynthese und genetische Defekte der untersuchten Hefemutanten

lüftung von Guanosintriphosphat in Anwesenheit von $FeSO_4$ und Mercaptoäthanol bewerkstelligt. Das so erhaltene N-Formyl-2,5-diamino-4-ribosylamino-6-hydroxypyrimidin-5'-triphosphat wurde von Enzymextrakten aus Lactobacillus plantarum gleichfalls in Folsäure umgewandelt. Als erstes fassbares Zwischenprodukt der enzymatischen Folsäurebiosynthese tritt 7,8-Dihydroneopterin-3'-triphosphat auf. Burg und Brown (44) konnten das entsprechende Enzym 700-fach anreichern. Sie zeigten, dass das diskelektrophoretisch reine Protein

Guanosintriphosphat in einem Zuge in Dihydroneopterintriphosphat umwandelt, ohne dass dabei Zwischenstufen nachgewiesen werden können. Die sog. GTP-Cyclohydrolase benötigt keine Cofaktoren. Die Autoren nehmen an, dass das Enzym eine Öffnung des Imidazolrings, gefolgt von einer Amadoriumlagerung und erneutem Ringschluss ausführt:

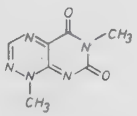


Guanosintriphosphat



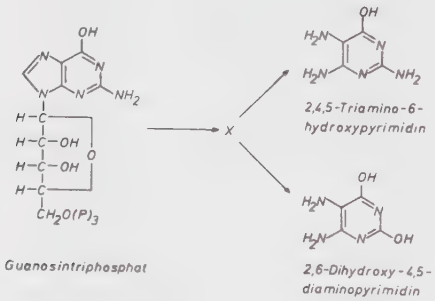
7,8 - Dihydroneopterin - 5'-triphosphat

Die Biogenese des Azapteridin-Antibiotikums Toxoflavin aus Pseudomonas cocvenenas wurde von Levenberg und Mitarbeitern untersucht.



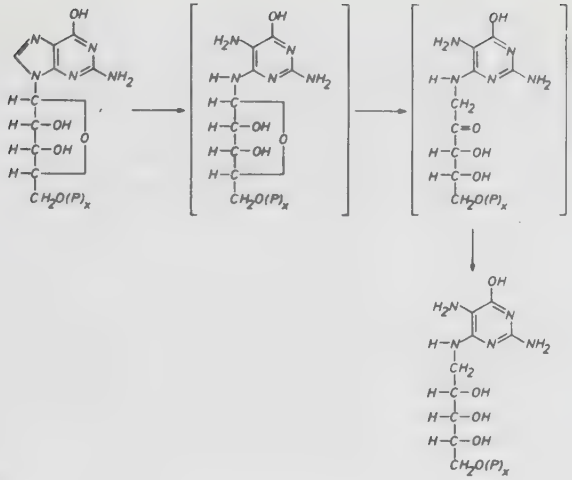
Toxoflavin

Levenberg und Kaczmarek (45) konnten aus Pseudomonas cocovenenans ein Enzym isolieren, welches gleichfalls den Imidazolring des Guanosintriphosphats öffnet. Als Reaktionsprodukte wurden durch Abfangen mit Glyoxal 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin und 2,6-Dihydroxy-4,5-diaminopyrimidin nachgewiesen. 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin selbst wird unter den Versuchsbedingungen nicht desaminiert. Die gefundenen Umsetzungen können durch das folgende Schema ausgedrückt werden:



Möglicherweise verläuft die Bildung des Riboflavinvorprodukts 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin über ähnliche Zwischenstufen (Schema 6) wie die Biosynthese der Folsäure.

Bei der Umwandlung von 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin werden 4 Kohlenstoffatome angefügt. Der Bericht von Goodwin und Treble (25) über den Einbau von ^{14}C-Acetoin ist neuerdings von Ali und Al-Khalidi (26) stark angezweifelt worden. Mutanten, die 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin akkumulieren, wachsen mit Diacetyl, aber nicht mit Acetoin. Die Beteiligung von Acetoin an der Riboflavinbiosynthese ist demnach nicht sehr wahrscheinlich.



Schema 6. Hypothetische Zwischenstufen bei der Bildung von 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin

Aus der wachstumsfördernden Wirkung von Diacetyl darf aber andererseits auch nicht ohne weiteres gefolgert werden, dass diese Substanz unter physiologischen Bedingungen an der Riboflavinbiosynthese beteiligt ist, da die Kondensation mit 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin auch auf nichtenzymatischem Wege erfolgen kann. Collins und Mitarbeiter (46,47) konnten zwar unlängst zeigen, dass in vielen Mikroorganismen Diacetyl nicht, wie bisher vermutet, durch Oxydation von Acetoin, sondern durch Kondensation von Pyruvat und Acetyl-CoA entsteht. Möglicherweise benutzt jedoch die bisher nicht aufgefundene

"Lumazinsynthetase" gar keinen fertigen 4-C-Vorläufer, sondern baut diesen selbst aus kleineren Untereinheiten auf.

2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin wurde zuerst bei der Mutante HK 859, später auch bei anderen Mutanten und beim Wildstamm nachgewiesen. Wahrscheinlich ist diese Substanz aus dem als Zwischenprodukt der Folsäurebiosynthese beschriebenen 7,8-Dihydro-2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin (48) durch Autoxydation entstanden. Als Akkumulat ist das dehydrierte Produkt früher nicht beschrieben worden.

2,6-Diamino-4-hydroxypteridin wurde gleichfalls bei der Mutante HK 859 und verschiedenen anderen Mutanten, nicht hingegen beim Wildstamm gefunden. Diese Substanz wurde schon von van Baalen und Forrest (49) bei Nostoc muscorum, Drosophila melanogaster und Anacystis nidulans nachgewiesen. Die Autoren nehmen an, dass sie durch Autoxydation hydrierter Pteridinverbindungen in Gegenwart von Ammoniumionen entsteht. Nach Abschluss der eigenen Untersuchungen haben auch Viscontini und Frater-Schroeder (50) über die Isolierung von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin und 2,6-Diamino-4-hydroxypyrimidin aus Pseudomonas fluorescens berichtet.

5. Material und Methoden

5.1. Geräte.

Folgende Geräte wurden zur Messung von UV-Spektren benutzt: PMQ II und RPM 20 A von Zeiss, Oberkochen, und Cary 14. IR-Spektren wurden mit dem Spektrographen von Leitz, Wetzlar, unter Benutzung der Mikroeinrichtung 5:1 in KBr gemessen. Zur Aufnahme der Massenspektren diente das doppelfokussierende Spektrometer MS 9 von AEI. Optische Rotationsspektren wurden mit dem Spektralpolarimeter REPM 12 von Zeiss, Oberkochen, gemessen. Trübungsmessungen wurden mit dem Photometer Eppendorf ausgeführt. Zur Radioaktivitätsmessung wurde der Flüssigszintillationszähler Tricarb 3314 von Packard und der Dünnschichtscanner MS RCG 1002/1 mit Methandurchflusszähler MS MD 632/2 und Zählratenmesser MS PR 1001/1 von Telefunken benutzt.

5.2. Reagenzien

Folgende Substanzen wurden nach bekannten Verfahren synthetisiert: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (11), 8-Ribityllumazin (20), 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-aminopyrimidin (11), 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin (51), 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin (51), 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin (52), 6,7-Dimethyllumazin (53), 4-Aminoimidazol-5-carboxamid (54).

2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin und 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7,8-trimethylpteridin waren ein Geschenk von Prof. Pfleiderer, Konstanz. 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin wurde freundlicherweise von Prof. Viscontini, Zürich, zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurden folgende Produkte benutzt: Diacetyl, Glyoxal und 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin von Fluka,

Riboflavin D.A.B. und DL-Tryptophan von Merck A.G., Adenin, Guanin und Hypoxanthin von Böhringer, Mannheim, Xanthosin von Sigma, ^{14}C-Harnstoff und 2-^{14}C-Guanin von Calbiochem, 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 2,4-Bis-(5-phenyloxazolyl-(2))-benzol (POPOP) und Triton 100 X von Packard.

Adsorbentien für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie wurden von folgenden Herstellern bezogen: Zellulose MN 300 und MN 400 von Macherey Nagel Co., Düren, saures Aluminiumoxid, Magnesiumsilikat und saures Aluminiumoxid DC für Dünnschichtchromatographie von Woelm, Eschwege, Kieselgel H und Aktivkohle 0,3 - 0,7 mm von Merck, Dowex 50 Wx8 von Ega, Sephadex G-10, CM-Sephadex C-25 und SE-Sephadex C-25 von Pharmacia.

5.3. Kulturmedien

a) Kulturmedien für Saccharomyces cerevisiae und Candida guilliermondii

Komplettmedium A: 10 g Yeast Extract (Difco), 10 g Bacto Pepton (Difco), 20 g Saccharose, 10 mg Riboflavin, 1 l Wasser.

Minimalmedium A: 0,875 g K_2HPO_4, 0,125 KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4 + 7\ H_2O$, 0,1 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2 + 2\ H_2O$, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 10 g Saccharose, 10 ml der nachstehenden Spurenlösung, 1 l Wasser.

Spurenlösung: 50 mg H_3BO_3, 4 mg $CuSO_4 + 4\ H_2O$, 10 mg KJ, 20 mg $FeCl_3 + 6\ H_2O$, 40 mg $MnSO_4 + 4\ H_2O$, 20 mg $(NH_4)_2MoO_4$, 1 mg Biotin, 1 l Wasser.

b) Kulturmedien für Aerobacter aerogenes

Komplettmedium B: 10 g Yeast Extract (Difco), 10 g Bacto Pepton (Difco), 20 g Glukose, 1 l deion. Wasser.

Komplettmedium C: 2 g Yeast Extract (Difco), 2 g Casamino Acids (Difco), 1,6 g Glukose, 80 mg DL-Tryptophan, 20 mg Guanin, 20 ml der nebenstehenden Mineralsalzlösung,

1 l deion. Wasser.
Mineralsalzlösung: 0,18 g $MgSO_4$ + 6 H_2O, 5 g KH_2PO_4, 1 g Zitronensäure, 1,7 g $NaNH_4HPO_4$ + 4 H_2O, 1 l deion. Wasser.

Komplettmedium D: 10 g Bacto Trypton (Difco), 5 g Yeast Extract (Difco), 2 g Glukose, 20 mg Guanin, 1 l deion. Wasser.

Minimalmedium B: 3,5 g K_2HPO_4, 1,5 g KH_2PO_4, 0,5 g Na-citrat, 0,1 g $MgSO_4$ + 7 H_2O, 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g Glukose, 40 mg L-Tyrosin, 40 mg L-Phenylalanin, 40 mg L-Tryptophan, 20 mg L-Histidin, 0,025 mg Thiamin, 0,005 mg p-Aminobenzoesäure, 1 l deion. Wasser.

Minimalmedium C: 12,8 g Na_2HPO_4 + 12 H_2O, 1,36 g KH_2PO_4, 2,7 g NH_4Cl, 20 mg $MgCl_2$ + 6 H_2O, 18,0 g Glukose, 4 mg DL-Tryptophan, 20 mg L-Histidin, 1 l deion. Wasser. Glukose wurde separat autoklaviert.

Salzlösung: 5,0 g NaCl, 0,12 g $MgSO_4$, 1 l deion. Wasser.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Medien bei 120° C 20 Min. autoklaviert. Für feste Nährböden wurde den Medien 2,1 % Agar (Difco) zugesetzt.

5.4. Stämme

Riboflavinmangelmutanten wurden durch Behandlung von Saccharomyces cerevisiae S 288 C mit Methansulfonsäure-äthylester erzeugt. 14 Mutanten wurden von Oltmanns und Lingens (28), 13 weitere im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen isoliert. Die Mutanten wurden auf Schrägröhrchen mit Komplettmedium A gehalten und im Abstand von 3 Monaten überimpft.

Candida guilliermondii (Stamm Burkholder) CBS 2021 wurde vom Centralbureau voor Schimmelkultures Baarn bezogen und alle drei Monate auf frisches Hefekomplett-medium überimpft.

Mutanten von Aerobacter aerogenes wurden durch Behandlung einer polyauxotrophen Mutante 62-1 mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin erzeugt. Der Nährstoffbedarf der untersuchten Mutanten geht aus Tabelle 8 hervor:

Mutante	Nährstoffbedarf	
62-1		
62-1 A	Guanin oder Hypoxanthin,	Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan
62-1 AB	Guanin,	

Tab.8. Nährstoffbedarf von Aerobacter-aerogenes-Mutanten

Die Mutanten wurden bei 4°C auf Schrägröhrchen mit Komplettmedium D gehalten und alle zwei Wochen überimpft.

Zur biologischen Riboflavinbestimmung diente Lactobacillus casei ATCC 7469.

5.5. Synthese von 2-^{14}C-Xanthin

Die Synthese von Xanthin aus 4-Aminoimidazol-5-carboxamid wurde zuerst von Shaw (55) beschrieben. 80 mg ^{14}C-Harnstoff (1 mC) und 200 mg 4-Aminoimidazol-5-carboxamid wurden in 1 ml Wasser gelöst und im Stickstoffstrom unter gelindem Erwärmen im Ölbad zur Trockne eingeengt. Das feste Gemisch wurde 2 Stunden im Ölbad auf 175° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die braune Schmelze in 15 ml N NaOH aufgenommen und nach Behandlung mit Aktivkohle (Darco G) mit verd. Essigsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und nochmals in der gleichen Weise umgefällt. Der Niederschlag wurde dann mit dest. Wasser gewaschen und in konz. Ammoniak aufgenommen. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt, bis ein flockiger Niederschlag auszufallen begann. Die Kristallisation wurde durch mehrtägiges Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt. Ausbeute 72 mg.

5.6. Isolierung von Mangelmutanten

5.6.1. Isolierung von Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae

Der haploide Wildstamm S 288 C wurde auf festem Komplettmedium A bei 30°C 2 Tage angezogen. Die Zellen wurden zweimal mit Salzlösung gewaschen und in M/15 Phosphatpuffer (p_H = 7) unter Zusatz von 2 % (v/v) Methansulfonsäureäthylester im Wasserbad bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 - 5 Stunden wurden Proben entnommen und nach entsprechender Verdünnung auf Komplettmedium A plattiert. Die Platten wurden 3 - 5 Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurden Proben von einzelnen Kolonien mit der Platinöse auf Minimalmedium und auf Riboflavin-Minimalmedium (10 mg/l) dünn ausgestrichen. Isolierungen, die nur auf dem Riboflavin-Medium wuchsen, wurden noch zweimal in derselben Weise durch Strichtest und anschliessend durch Blättchentest (56) geprüft.

5.6.2. Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes

Die Mutante 62-1 wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln in 10 ml Komplettmedium B angezogen. 0,3 ml der Übernachtkultur wurden in 10 ml frisches Komplettmedium überimpft und weitere 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. 1 ml der Zellsuspension wurde entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit Salzlösung gewaschen und in 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer (p_H = 6) nach Mc Ilvaine unter Zusatz von Magnesiumsulfat (0,12 g/l) und 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (100 mg/l) bei 37° C unter Schütteln eine Stunde inkubiert. Die

Zellen wurden dann abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen und in 10 ml Salzlösung suspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde mit 10 ml Komplettmedium B versetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wurden die Zellen nach geeigneter Verdünnung auf Komplettmedium B plattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Bakterienkolonien wurden dann mit Hilfe von sterilem Samt auf Minimalmedium B und auf Guanin-Minimalmedium B (20 mg/l Guanin) übertragen. Kolonien, die nur auf dem Guaninmedium wuchsen, wurden durch Strichtest und Blättchentest weiter überprüft. Es wurden 5 guaninbedürftige Mutanten isoliert, von denen 4 auch mit Hypoxanthin wuchsen und demnach im Grundzweig der Purinbiosynthese blockiert waren. Die Riboflavinproduktion der letzteren wurde durch Akkumulationsversuche (s.u.) ermittelt. Die Mutante 62-1 A lieferte am meisten Riboflavin (ca. 2,5 mg/l) und wurde deshalb als Ausgangsstamm für die weiteren Mutationsversuche benutzt. Dazu wurde sie wie beschrieben mit Mutagen behandelt und nach Zwischenzüchtung auf Komplettmedium B plattiert. Die Bakterienkolonien wurden auf Hypoxanthin- und Guanin-Minimalmedium B (je 20 mg/l) gestempelt. Es wurden 13 Stämme isoliert, die mit Guanin, aber nicht mit Hypoxanthin wuchsen. 7 von diesen Mutanten wuchsen bei der Prüfung im Blättchentest mit Xanthin oder Guanin, 6 hingegen nur mit Guanin. Unter den letzteren produzierte 62-1 AB am meisten Riboflavin (ca. 2 mg/l).

5.6.3. Mangelmutanten von Candida guilliermondii

Candida guilliermondii (Stamm Burkholder) wurde in Komplettmedium A unter Schütteln bei 30° 2 Tage angezogen. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und mit Methansulfonsäureäthylester, wie oben beschrieben, behandelt (s. 5.6.1).

Nach 1 - 8 Stunden wurden Proben entnommen und nach Verdünnung auf Komplettmedium A plattiert. Proben von einzelnen Kolonien wurden auf Minimalmedium A und auf Komplettmedium A ausgestrichen. Zur Unterdrückung der Riboflavinbildung wurde dem Minimalmedium Eisen(II)sulfat (50 mg/l) zugesetzt. Isolierungen, die nur auf Komplettmedium wuchsen, wurden durch zwei weitere Strichteste überprüft. Der Nährstoffbedarf von 130 Mutanten wurde von Oltmanns durch Blättchentest ermittelt. 319 weitere Mutanten wurden durch Ausstreichen auf Minimalmedium und Riboflavin-Minimalmedium A auf Riboflavinbedürftigkeit untersucht.

5.7. Isolierung und Untersuchung von Hefeakkumulaten

Sämtliche Arbeiten an Hefeakkumulaten wurden wegen der starken Lichtempfindlichkeit der untersuchten Substanzen im Dunkeln oder unter weitgehendem Lichtausschluss ausgeführt.

5.7.1. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen

a) Versuche im Labormaßstab: Je eine Platinöse Hefezellen wurde in Flaschen mit 0,5 l Komplettmedium A geimpft und unter gelegentlichem Umschütteln 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 2 mal mit Salzlösung gewaschen und zur Akkumulation in demselben Volumen Minimalmedium A suspendiert. Der Zusatz von Glyoxal (0,3 g/l) bzw. Diacetyl (0,6 g/l) erfolgte gemäss den obigen Angaben (s. Tab.3). Nach Inkubation im Dunkeln bei 30°C (8 Stunden oder über Nacht) wurden die Zellen abzentrifugiert. Das zellfreie Medium wurde entweder sofort aufgearbeitet oder nach Zusatz von Diacetyl (0,6 g/l) nochmals mehrere Stunden

bei 30° inkubiert. Da sich zeigte, dass wegen der kräftigen Säureproduktion der Hefen während der kurzen Akkumulationsperiode keine Infektionen auftreten können, wurde zur Akkumulation unsteriles Minimalmedium benutzt. Dieses wurde unmittelbar vor Gebrauch bereitet.

b) Versuche im 100-Liter-Fermentor wurden mit der Mutante HK 859 ausgeführt. Die Mutante wurde wie beschrieben in 2 Flaschen mit je 0,5 l Komplettmedium A geimpft. Nach 2-tägiger Inkubation bei 30° wurde die Kultur in einen New-Brunswick-Labor-Fermentor mit 10 l Komplettmedium A (100 mg/l Riboflavin) überführt und 24 Stunden bei 30°C mit 100 rpm gerührt. Die Zellsuspension wurde dann in einen Fermentor (New Brunswick Fermacell oder Marubishi M 100) mit 100 l Minimalmedium überführt und unter Rühren weitere 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia) abzentrifugiert und in 100 l frisches Minimalmedium unter Zusatz von 0,8 ml/l Diacetyl über Nacht inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen im Dunkeln abzentrifugiert. Aus dem zellfreien Medium wurden die akkumulierten Pteridine gewonnen. (s.u.).

5.7.2. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, 8-Ribityllumazin und Riboflavin

Diese Produkte konnten im wesentlichen nach derselben Methode isoliert und angereichert werden.

2 l von Zellen befreites Akkumulationsmedium wurden bei 30° im Vakuum auf ein kleines Volumen (ca. 20 ml) eingeengt und auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (H^+-Form, 1,7 x 22 cm, deion. Wasser) gegeben. Die Lumazinderivate liessen sich mit deion. Wasser eluieren. 8-Ribityllumazin erschien nach 30 ml, 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin nach 300 ml Eluat. Riboflavin wurde anschliessend mit 0,05 N HCl eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Vakuum auf ca.

1 ml eingeengt und mit 5 ml Äthanol versetzt. Diese Lösungen wurden auf Säulen aus saurem Aluminiumoxid gegeben und mit 80 % Äthanol eluiert.

Die intensiv fluoreszierenden Akkumulate wurden eingeengt und nochmals an Dowex 50 Wx8 (1x15 cm), wie oben beschrieben, chromatographiert. Die Eluate wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt.

5.7.3. 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin

200 l zellfreies Akkumulationsmedium wurden mit Wasserstrahlvakuum durch eine Säule aus Magnesiumsilikat (7x12 cm) gesaugt (Durchfluss ca. 40 l/h). Die Säule wurde mit 10 l Leitungswasser gewaschen und alles fluoreszierende Material mit 2 l Aceton/2 N Ammoniak (2:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum bei 30°C zur Trockne eingeengt und in 20 ml deion. Wasser aufgenommen. Dabei bildete sich ein schleimiger, voluminöser Niederschlag, der abzentrifugiert und verworfen wurde. Der Überstand wurde auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (Na^+-Form, 2,5 x 40 cm, deion. Wasser) gegeben und zunächst mit 0,5 l deion. Wasser und anschliessend mit 0,1 M Phosphatpuffer p_H = 7 eluiert. Es wurden Fraktionen von 10 ml aufgefangen. Proben von den einzelnen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie an Zellulose MN 300 (Entwicklung in 3 % NH_4Cl) untersucht. 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin und 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin waren in den Fraktionen 15 - 18 bzw. 19 - 21 enthalten. Die weitere Reinigung dieser Substanzen wird weiter unten beschrieben. 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribitylpteridin war in den Fraktionen 150 - 300 enthalten. Diese intensiv grün fluoreszierenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Konzentrierung über eine Säule aus Magnesiumsilikat (2,5 x 2,5 cm) gegeben. Die Säule wurde mit 300 ml deion. Wasser gewaschen und das Pteridinderivat mit Aceton/2 N

Ammoniak (2 : 1, v/v, 200 ml) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt, in 10 ml deion. Wasser aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule aus CM-Sephadex C-25 (2,5 x 40 cm, Na^+-Form, deion. Wasser) gegeben und mit deion. Wasser eluiert (10 ml-Fraktionen). Die grün fluoreszierenden Fraktionen (20 - 35) wurden vereinigt, mit konz. Salzsäure schwach angesäuert und lyophilisiert. Das erhaltene gelbe Material wurde in wenig Wasser aufgenommen und auf 5 mit saurem Aluminiumoxid DC beschichtete Platten (20 x 20 x 0,3 cm) aufgetragen. Nach dem Trocknen im Luftstrom wurden die Platten in einem Gemisch aus n-Butanol/Eisessig/Wasser (60 : 15 : 25, v/v) entwickelt. Die grün fluoreszierende Zone bei R_f = 0,42 wurde sofort nach dem Entwickeln von den feuchten Platten abgekratzt und das Adsorbens in 500 ml dest. Wasser suspendiert. Nachdem sich das Aluminiumoxid abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgegossen und der Schlamm nochmals mit 500 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten Lösungen wurden durch Adsorption an Magnesiumsilikat und Elution mit Aceton/Ammoniak konzentriert, wie oben beschrieben. Anschliessend wurde die Substanz nochmals der Chromatographie an CM-Sephadex C-25 unterworfen (s.o.). Die grün fluoreszierenden Fraktionen wurden vereinigt, mit HCl angesäuert und lyophilisiert.

7.4. 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin

Die Substanz wurde aus dem rohen Akkumulationsgemisch der Mutante HK 859 durch Chromatographie an Dowex 50, wie oben beschrieben, abgetrennt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockne eingeengt, in wenig N HCl gelöst und auf eine Säule aus Dowex Wx8 (H^+-Form, 1,5 x 25 cm, N HCl) gegeben und mit N HCl eluiert. Fraktionen von 15 ml wurden gesammelt. Die Ex-

tinktion der einzelnen Fraktionen bei 322 nm wurde gemessen. Die Fraktionen 37-46, die das Pteridinderivat enthielten, wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Anschliessend wurde die Chromatographie an Dowex 50 in der gleichen Weise wiederholt. Die erhaltene farblose Substanz wurde zweimal aus wenig dest. Wasser umkristallisiert.

5.7.5. 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin

Dieses Pteridinderivat wurde gleichfalls durch Chromatographie an Dowex 50 aus dem rohen Akkumulatgemisch der Mutante HK 859 abgetrennt (s.5.7.3.). Die vereinigten Fraktionen wurden auf ein kleines Volumen eingeengt und in 0,1 N Natriumacetatpuffer (p_H = 4,5) aufgenommen. Die Lösung wurde auf eine Säule aus SE-Sephadex C-25 (2,5 x 40 cm, Na^+-Form im Gleichgewicht mit 0,1 N Acetatpuffer p_H = 4,5) aufgegeben und mit demselben Puffer eluiert. Die grün fluoreszierenden Fraktionen wurden vereinigt, mit Salzsäure auf p_H = 1 angesäuert und zur Entfernung des Puffers auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (H^+-Form, 1,5 x 20 cm) gegeben. Die Säule wurde mit 1 Liter N HCl und anschliessend mit 0,5 l deion. Wasser gewaschen. Dann wurde mit N Ammoniak eluiert. Das Pteridinderivat erschien in der Front. Die grün fluoreszierende Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die Chromatographie an SE-Sephadex und die anschliessende Entsalzung an Dowex 50 wurde in derselben Weise wiederholt. Dann wurde die gelbe Substanz aus dest. Wasser kristallisiert.

5.8. Wachstumsversuche

Hefemutanten wurden in 5 ml Komplettmedium A über Nacht angezogen, 2 mal mit Salzlösung gewaschen und in 50 ml Salzlösung suspendiert. Röhrchen mit 5 ml Minimalmedium A, dem die zu prüfende Substanz zugesetzt wurde, wurden mit je 1 Tropfen der Hefesuspension beimpft und 3 - 5 Tage bei 30°C bebrütet. Die Zelldichte wurde durch Trübungsmessung im Photometer Eppendorf bestimmt. Die zu prüfenden Zusätze wurden in sterilem Medium gelöst und anschliessend steril filtriert.

5.9. Einbau radioaktiv markierter Purine bei Purinmangelmutanten von Aerobacter aerogenes

5.9.1. Züchtung und Akkumulation

Von einem frisch überimpften Schrägröhrchen der Mutante 62-1 AB wurde eine Platinöse Zellen in 0,5 ml Komplettmedium C geimpft und bei 37°C auf einer Rundschüttelmaschine (200 rpm) inkubiert, bis die Extinktion einer steril entnommenen Probe bei Messung im Photometer Eppendorf (Filter "Trübungsmessung", 1 cm Quarzküvetten) den Wert 1,35 erreicht hatte. Dies war i.A. nach ca. 18 Stunden der Fall. Die Zellen wurden dann unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert, einmal mit steriler Salzlösung (250 ml) gewaschen und in 400 ml sterilem Minimalmedium C mit Zusätzen gemäss Tab. 7 suspendiert. Glukose und ^{14}C-markierte Substanzen wurden je separat autoklaviert. Die Zellsuspension wurde 6 Stunden bei 37°C im Dunkeln geschüttelt (200 rpm) und anschliessend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und verworfen. Aus dem Überstand wurden Riboflavin und Xanthosin isoliert.

5.9.2. Isolierung von Riboflavin und Xanthosin

Das von Zellen befreite Minimalmedium wurde im Dunkeln über eine Säule aus Magnesiumsilikat (Ø 2 cm, Höhe 1 cm) und anschliessend durch eine Säule aus 4 g gekörnter Aktivkohle (0,9 x 10 cm) gegeben. Riboflavin wurde auf der Magnesiumsilikatsäule vollständig zurückgehalten. Die Säule wurde mit deion. Wasser (100 ml) gewaschen und mit 100 ml Aceton/2 N Ammoniak (2:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt. Xanthosin wurde an der Kohlesäule adsorbiert. Die Säule wurde mit 100 ml deion. Wasser gewaschen und anschliessend mit 400 ml einer Mischung von Äthanol/konz. Ammoniak/Wasser (25:10:65, v/v) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt. Riboflavin wurde folgendermassen weiter gereinigt: Das unreine Material wurde in wenig Wasser aufgenommen und auf eine Säule aus CM-Sephadex C-25 (2,5 x 40 cm) gegeben, die vorher mit 0,1 N Citrat-Phosphat-Puffer (p_H = 5), dann mit 0,001 N Puffer äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit 0,001 N Citrat-Phosphat-Puffer (p_H = 5). Fraktionen von 15 ml wurden aufgefangen. Flavinmononukleotid wurde in den Fraktionen 6-7 eluiert und verworfen. Riboflavin war in Fraktion 15-18 enthalten. Diese Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Die Lösung wurde auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (0,9 x 10 cm, H^+-Form) gegeben und mit 0,12 N HCl eluiert. Die gelb gefärbten Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Das erhaltene gelbe Material wurde an einer Säule aus Sephadex G-10 (2,5 x 90 cm) im Gleichgewicht mit dest. Wasser chromatographiert. Die gelb fluoreszierenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt.

Xanthosin wurde folgendermassen gereinigt: Das Eluat der Kohlesäule, das ausser Xanthin auch sämtliche anderen,

im Medium enthaltenen Purinverbindungen enthielt, wurde zur Trockne eingeengt. Das erhaltene, sirupöse, braune Material wurde in wenig Wasser gelöst und auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (1,5 x 27 cm, H^+-Form, im Gleichgewicht mit 0,05 N HCl) gegeben. Die Säule wurde mit 0,05 N HCl eluiert und 10 ml-Fraktionen aufgefangen. Die optische Dichte des Eluats wurde mit dem Uvicord I (LKB Stockholm) fortlaufend registriert. Xanthosin war in den Fraktionen 34-43 enthalten (Abb.12). Diese Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. (Es war nicht möglich, die Lösung im Vakuum einzuengen, da dabei durch die unvermeidliche Konzentrierung der Salzsäure ein beträchtlicher Teil des Xanthosins hydrolisiert wird.) Die erhaltene, farblose Substanz wurde in wenig Wasser aufgenommen und an einer Säule aus Sephadex G-10 (2,5 x 75 cm) im Gleichgewicht mit dest. Wasser rechromatographiert. Die optische Dichte wurde mit dem Uvicord I (LKB) registriert. Xanthosin war in den Fraktionen 14-16 enthalten (10-ml Fraktionen). Die Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt.

5.9.3. Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität der eingesetzten Verbindungen wurde durch Flüssigkeitszintillationszählung im Packard Tricarb bestimmt. Da die zu messenden Substanzen sich schlecht in organischen Lösungsmitteln lösen, wurde der emulgierende Szintillator nach Patterson und Greene (33) benutzt. Messproben wurden in 1 ml dest. Wasser gelöst und mit 15 ml Szintillator versetzt. Die Proben wurden unter mehrmaligem Umschütteln auf die Messtemperatur (-4°C) abgekühlt. Die Verstärkung des Messgeräts wurde auf 8 %, die Kanallage auf 50-1000 eingestellt. Quencheffekte wurden durch interne Standardisierung mit 2-^{14}C-Guanin eliminiert. Dazu wurden

Proben präpariert, die ausser der zu messenden Substanz noch 200 000 cpm 2-^{14}C-Guanin (spez. Akt. 9,4 mC/mM) enthielten. Die Quencheffekte lagen bei allen Messungen unterhalb 3 %.

6. Zusammenfassung

Obwohl seit 1950 weit über hundert Veröffentlichungen aus verschiedenen Arbeitskreisen über die Biosynthese des Riboflavins erschienen sind, blieben die gewonnenen Ergebnisse sehr lückenhaft. Es konnte lediglich das unmittelbare Vorprodukt des Riboflavins, 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, nachgewiesen werden. Ausserdem wurde gezeigt, dass eine Purinverbindung unbekannter Struktur als Ausgangsprodukt dient. Die bisherigen Untersuchungen beschränkten sich auf die sog. flavinogenen Organismen wie z.B. Ashbya gossypii.

Auf der Suche nach weiteren Zwischenprodukten wurden Untersuchungen an 27 Riboflavinmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae angestellt, die von O. Oltmanns bzw. im Verlauf der vorliegenden Arbeit isoliert wurden. Fünf Mutanten bilden in Minimalmedium das aus früheren Untersuchungen bekannte 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Die Substanz wurde mit Hilfe chromatographischer Methoden isoliert. Sie fördert das Wachstum einiger früher blockierter Mutanten.

Zwölf Mutanten akkumulieren 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-amino-pyrimidin. Die Konstitution dieser sehr labilen Verbindung wurde durch Umsetzung mit Glyoxal bzw. Diacetyl zu 8-Ribityllumazin bzw. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ermittelt. Die Mutanten werden durch Diacetyl zur Riboflavinbildung befähigt. In Anwesenheit von Diacetyl akkumulieren sie Riboflavin und können mit Diacetyl anstelle von Riboflavin wachsen.

Vier Mutanten bilden 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxy-pyrimidin. Dieses wurde nach Umsetzung mit Diacetyl in Form von 4,8-Dihydro-2-amino-4-oxo-6,7-dimethyl-8-ribityl-pteridin isoliert. Da die äusserst lichtempfindliche Substanz nur in Mengen von wenigen Mikrogramm pro Liter im Medium enthalten ist, mussten über 1000 Liter Kulturmedium aufgearbeitet werden. Die Konstitution des Pteridinderivats wurde durch photochemischen Abbau und durch UV-, IR-, optische Rotations- und Massenspektrometrie ermittelt und durch Synthese bestätigt.

Die Bedeutung von 2,6-Dihydroxy-4-ribitylamino-5-amino-pyrimidin und 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin als Zwischenprodukte der Riboflavinbiosynthese wird diskutiert. Ein einfaches Verfahren zur raschen biochemischen Klassifizierung von Riboflavinmangelmutanten wird beschrieben.

Im Kulturmedium verschiedener Mutanten wurde neben den genannten Riboflavinvorprodukten 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridin und 2,6-Diamino-4-hydroxypteridin aufgefunden. Die Konstitution dieser Substanzen wurde durch chromatographische und spektroskopische Methoden ermittelt. Die Ursache für ihr Auftreten ist nicht bekannt.

Obwohl seit langem bekannt ist, dass als Ausgangsprodukt der Riboflavinbiosynthese eine Purinverbindung dient, konnte deren Struktur bisher nicht genauer ermittelt werden. Das Auftreten von 2,5-Diamino-4-ribitylamino-6-hydroxypyrimidin deutete auf eine Guaninverbindung als Ausgangsprodukt. Zur Prüfung dieser Annahme wurde eine Mutante von Aerobacter aerogenes isoliert, die keine Purine mehr bilden und Xanthinverbindungen nicht mehr in Guaninverbindungen umwandeln kann. Mit Hilfe dieser Mutante wurde der Einbau von 2-^{14}C-Guanin und 2-^{14}C-Xanthin in Riboflavin und Xanthosin untersucht. 2-^{14}C-Guanin wird ohne nennenswerte Verdünnung in Riboflavin eingebaut, 2-^{14}C-Xanthin hingegen wird nicht eingebaut. Daraus folgt, dass die Biosynthese des Riboflavins mit einer Guaninverbindung beginnt.

7. Literaturangaben

1 T.W. Goodwin, The Biosynthesis of Vitamins and Related Compounds, Academic Press, London 1963

2 J.A. Mc Laren, J. Bacteriol. 63, 233 (1952)

3 G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 208, 513 (1954)

4 F. Weygand u. M. Waldschmidt, Angew. Chem. 67, 328 (1955)

5 W.S. Mc Nutt, J. biol. Chem. 210, 511 (1954)

6 D.J. Howells u. G.W.E. Plaut, Biochem. J. 94, 755 (1965)

7 T. Masuda, Pharm. Bull. (Tokyo) 4, 71 (1956), C.A. 51, 2931d (1957)

8 T. Masuda, Pharm. Bull. (Tokyo) 4, 72 (1956), C.A. 51, 2931e (1957)

9 T. Masuda, Pharm. Bull. (Tokyo) 4, 375 (1956), C.A. 51, 11454e (1957)

10 T. Masuda, Pharm. Bull. (Tokyo) 5, 28 (1957), C.A. 52, 399g (1958)

11 G.F. Maley u. G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 234, 641 (1959)

12 G.W.E. Plaut u. G.F. Maley, J. biol. Chem. 234, 3010 (1959)

13 G.W.E. Plaut u. G.F. Maley, Arch. Biochem. 80, 219 (1959)

14 T. Masuda, Pharm. Bull. (Tokyo) 5, 136 (1957), C.A. 52, 4oob (1958)

15 T. Rowan u. H.C.S. Wood, Proc. chem. Soc. (London) 1963, 21

16 G.F. Maley u. G.W.E. Plaut, J. Am. chem. Soc. 81, 2025 (1959)

17 T.W. Goodwin u. A.A. Horton, Nature (London) 191, 772 (1961)

18 G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 235, PC 41 (1960)

19 G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 238, 2225 (1963)

20 H. Wacker, R.A. Harvey, C.H. Winestock u. G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 239, 3493 (1964)

21 R.A. Harvey u. G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 241, 2120 (1966)

22 T. Masuda, T. Kishi, M. Asai u. S. Kuwada, Chem. Pharm. Bull. (Japan) 6, 523 (1958), C.A. 53, 12394f (1959)
23 G.W.E. Plaut, Ann. Rev. Biochem. 30, 409 (1961)
24 S. Kuwada, T. Masuda, T. Kishi u. M. Asai, Chem. Pharm. Bull. (Japan) 6, 618 (1958), C.A. 54, 24768c (1960)
25 T.W. Goodwin u. D.H. Treble, Biochem. J. 70, 14P (1958)
26 S.N. Ali u. U.A.S. Al-Khalidi, Biochem. J. 98, 182 (1966)
27 G.W.E. Plaut, J. biol. Chem. 211, 111 (1954)
28 O. Oltmanns u. F. Lingens, Z. Naturforsch. 22b, 751 (1967)
29 Difco Manual, 9th edition, p. 214
30 G.M. Brown, R.A. Weisman u. D.A. Molnar, J. biol. Chem. 236, 2534 (1961)
31 M.I. Gibson u. F. Gibson, Biochem. J. 90, 248 (1964)
32 B. Magasanik u. D. Karibian, J. biol. Chem. 235, 2672 (1960)
33 M.S. Patterson u. R.C. Greene, Anal. Chem. 37, 854 (1965)
34 F. Korte u. H.U. Aldag, Liebigs Ann. Chem. 628, 144 (1959)
35 A.C. Wilson u. A.B. Pardee, J. gen. Microbiol. 28, 283 (1962)
36 H. Katagiri, I. Takeda u. K. Imai, J. Vitaminol. (Japan) 5, 287 (1959), C.A. 54, 17541b (1960)
37 C. Yanofsky, Biochim. Biophys. Acta 20, 438 (1956)
38 F. Lingens, H.J. Burkhardt, H. Hellmann u. F. Kaudewitz, Z. Naturforsch. 12b, 493 (1957)
39 T.W. Goodwin u. D.H. Treble, Biochem. J. 67, 10P (1957)
40 P. Hemmerich, C. Veeger u. H.C.S. Wood, Angew. Chem. 77, 699 (1965)
41 A.W. Burg u. G.M. Brown, Biochim. Biophys. Acta 117, 275 (1966)
42 T.H.D. Jones u. G.M. Brown, J. biol. Chem. 242, 3989 (1967)
43 T. Shiota, M.P. Palumbo u. L. Tsai, J. biol. Chem. 242, 1961 (1967)

44 A.W. Burg u. G.M. Brown, J. biol. Chem. 243, 2349 (1968)
45 B. Levenberg u. D.K. Kaczmarek, Biochim. Biophys. Acta 117, 272 (1966)
46 R.A. Speckman u. E.B. Collins, J. Bacteriol. 95, 174 (1968)
47 L.F. Chuang u. E.B. Collins, J. Bacteriol. 95, 2083 (1968)
48 R.A. Weisman u. G.M. Brown, J. biol. Chem. 239, 326 (1964)
49 C. van Baalen u. H.S. Forrest, J. Am. chem. Soc. 81, 1770 (1959)
50 M. Viscontini u. M. Frater-Schroeder, Helv. chim. Acta 51, 1554 (1968)
51 J. Davoll u. D.D. Evans, J. chem. Soc. 1960, 5041
52 C.M. Baugh u. E. Shaw, J. org. Chem. 29, 3610 (1964)
53 R. Kuhn u. A.H. Cook, Chem. Ber. 70B, 761 (1937)
54 E. Shaw u. D.W. Woolley, J. biol. Chem. 181, 89 (1949)
55 E. Shaw, J. biol. Chem. 185, 439 (1950)
56 F. Lingens u. O. Oltmanns, Z. Naturforsch. 19 b, 1058 (1964)

Lebenslauf

Am 10. September 1941 wurde ich als erstes Kind des Kaufmanns Ernst Bacher und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Hamann, in Birkenfeld/Wttbg. geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Birkenfeld, anschliessend das Gymnasium in Neuenbürg, wo ich im Frühjahr 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1960 begann ich das Studium der Chemie an der Universität Tübingen. Seit dem Sommersemester 1963 bin ich ausserdem bei der medizinischen Fakultät eingeschrieben. Die mündliche Diplomprüfung in Chemie legte ich im Mai 1966 ab. Anschliessend fertigte ich unter der Leitung von Prof. Dr. F. Lingens eine Diplomarbeit "Über die Biosynthese des Riboflavins bei Hefen" an. Im Januar 1967 begann ich unter Leitung von Prof. Dr. F. Lingens mit der Anfertigung einer Doktorarbeit "Über die Biosynthese des Riboflavins".

Am 27. Juni 1968 heiratete ich Fräulein Dr. med. Mechthild Badenheuer.

Meine akademischen Lehrer waren:
E. Bayer, E. Buddecke, W. Bues, E. Bünning, H. Friedrich-Freksa, A. Gierer, K. Grell, M. Hanack, H. Hellmann, G. Hillmann, F. Kaudewitz, W. Kiedaisch, G. Kortüm, H. Krüger, F. Lingens, H. Mauser, E. Müller, W. Nultsch, G. Opitz, G. Pickert, W. Rundel, W. Rüdorff, G. Schramm, W. Schweizer, B. Schwemmle, H. Suhr, G. Weitzel, H. Wielandt.

BAMBERGER FOTODRUCK - RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG - Markusplatz 22 - Tel.: 09 51/6 27 94